



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de doctorado en Biomedicina y Biotecnología

**Papel del complejo de proteínas *Rab-Rabphilin* en un
modelo de daño renal en *Drosophila***

Tesis Doctoral

Estela Selma Soriano

Octubre 2019

Trabajo dirigido por:

Dr. Rubén D. Artero Allepuz



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Departament de Genètica [Ò≈]

Dr. D. Rubén Artero Allepuz, Profesor titular del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València,

Certifica

Que Dña. Estela Selma Soriano, licenciada en Biología por la Universitat de València, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación original recogido en la presente memoria titulada “Papel del complejo de proteínas *Rab-Rabphilin* en un modelo de daño renal en *Drosophila*”, para optar al Grado de Doctor por la Universitat de València.

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del mismo, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor por la Universitat de València dentro del Programa Oficial de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología.

En Valencia, a 17 de octubre de 2019

Dr. Rubén Artero Allepuz

Als meus pares

A Josep

AGRAÏMENTS

Escriure aquest apartat significa que aquest treball ha arribat a la fi. Estos agraïments van destinats a tots aquells que han estat amb mi durant aquesta etapa.

Em considere una persona afortunada, sempre he tingut el suport i l'enteniment de la meua gent volguda; els meus pares, la família, els amics i Josep. Ells són qui em van donar l'espenta per començar, per continuar i per acabar. Tia Carmen, gràcies per sentir-te tant orgullosa de mi i per fer-me sentir volguda. Pare i mare, gràcies per fer l'esforç i el sacrifici que heu tingut que afrontar, moltes gràcies per estar sempre amb mi!

Aquest treball no haguera sigut possible sense la direcció i l'ajuda del Dr. Rubén Artero, la Dra. Beatriz Llamusí i el Dr. Josep Redón. Gràcies per confiar amb mi i donar-me l'oportunitat de formar-me professionalment. Gràcies de tot cor.

Durant aquests 4 anys he tingut la immensa sort de conèixer persones que sé que formaran part de mi durant tota la vida. Mouli ha sigut, és i serà un membre més de la meua família. La meua *señora*, com li dic jo, sempre ha estat amb mi. Junes hem compartit bons (i no tan bons) moments: dinars i sopars, festes del poble, viatges, excursions... Els temps ens ha distanciat físicament però no sentimentalment. Ami o tomak anak bhalobasi! El mateix ha passat amb Ayda, la seua tendresa em va guanyar el cor. No disposarem de massa temps per fer més coses que teníem plantejades, però ara tenim una altra oportunitat per compartir-los, m'alegra que tornes!

Gràcies a tots els membres del laboratori! JuanMa i Bea moltes gràcies pels vostres consells i per compartir part de la vostra vida amb mi! M'heu fet partícip de les vostres celebracions i m'heu fet sentir com a casa en el treball, gràcies! A totes els estudiants que m'han ajudat amb les tasques científiques, en especial a Katie i Lauren! I gràcies a Ascen per ser la meua companya de confidències i amiga durant l'últim any.

Gràcies a Tica, Imma i Ximo per donar-me la vostra força incansable, per interessar-vos pels meus estudis i per fer-me sentir que sóc part de la vostra família.

A Fina, Rufino i els meus oncles polítics agrair-vos l'ajuda, els consells i les preocupacions que heu tingut per mi. Gràcies per animar-me i fer-me veure les coses que importen.

Finalment, donar-li les gràcies a Josep. Has estat incondicionalment al meu costat, m'has ajudat en tot allò que he necessitat i m'has fet sentir molt estimada. T'estime!

"Aquel día, sin ninguna razón en particular, decidí salir a correr. Corrí hasta el final del camino, y cuando llegué, pensé que tal vez podía correr hasta el final del pueblo. Y cuando llegué, pensé que tal vez podía correr hasta el condado de Greenbow. Noté que, si había llegado tan lejos, tal vez podía correr a través del gran estado de Alabama. Corrí derecho hasta el océano. Y cuando llegué, noté que ya había llegado lejos, y que tal vez debía dar la vuelta y continuar corriendo"

Forrest Gump.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABREVIACIONES	5
INTRODUCCIÓN	11
1. El sistema renal humano.....	11
2. La enfermedad renal.....	13
3. El sistema excretor de <i>Drosophila melanogaster</i>	14
3.1 Nefrocitos	16
3.1.1 Función de los nefrocitos.	17
3.1.2 Estructura y morfología de los nefrocitos	18
3.1.3 Características moleculares de los nefrocitos.....	20
3.2 Túbulos de Malpighi	22
4. Sistemas modelo para el estudio de enfermedades renales: <i>Drosophila melanogaster</i> ..	23
4.1 Los nefrocitos de <i>Drosophila</i> como modelo para el estudio de enfermedades renales.	24
4.1.1 Ejemplos de enfermedades renales estudiadas en <i>Drosophila melanogaster</i>	25
5. El complejo <i>Rabphilin-Rab</i> en el sistema renal de mamíferos y <i>Drosophila</i>	26
6. Relación entre la enfermedad renal y la cardiovascular	30
7. La nefropatía diabética	32
OBJETIVOS	41
CAPÍTULO 1	47
<i>Rabphilin</i> es necesaria para la filtración, endocitosis y mantenimiento de los nefrocitos pericárdicos de <i>Drosophila melanogaster</i>	47
1.1 Introducción.....	47
1.2 Material y métodos	48
1.2.1 Líneas de <i>Drosophila</i>	48
1.2.2 Análisis de la supervivencia de <i>Drosophila</i>	49
1.2.3 Ensayo de toxicidad.....	49
1.2.4 Inmunofluorescencia.....	49
1.2.5 Cuantificación del volumen y el número de nefrocitos	50
1.2.6 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	50
1.2.7 Análisis de las estructuras celulares del nefrocitos de imágenes tomadas con microscopio electrónico de transmisión (TEM)	50
1.2.8 Análisis <i>in vivo</i> de la filtración y la captación de moléculas de dextrano	51

1.2.9	Análisis cuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-qPCR).....	51
1.3	Resultados	51
1.3.1	<i>Rabphilin</i> se expresa en los nefrocitos pericárdicos de <i>Drosophila</i>	51
1.3.2	<i>Rph</i> mantiene el estado de diferenciación de los nefrocitos.	52
1.3.3	La expresión reducida de <i>Rph</i> altera el tráfico vesicular en nefrocitos	54
1.3.4	La interferencia de la expresión de <i>Rph</i> en los nefrocitos altera la reabsorción de las moléculas	58
1.3.5	Se requiere <i>Rph</i> para mantener la estructura de los canales laberínticos	60
1.3.6	El ácido retinoico rescata los defectos en la filtración y la endocitosis causados por la interferencia en la expresión de <i>Rph</i>	61
1.4	Discusión.....	66
CAPÍTULO 2.	73
La interferencia de la expresión de <i>Rabphilin</i> en el sistema cardiaco de <i>Drosophila</i> provoca cardiopatía.		
2.1	Introducción.....	73
2.2	Materiales y métodos	74
2.2.2	Análisis de la supervivencia de <i>Drosophila</i>	75
2.2.3	Inmunofluorescencia.....	75
2.2.4	Análisis de los parámetros cardiacos	75
2.2.5	Tinción con faloidina	75
2.2.6	Histología.....	75
2.3	Resultados	76
2.3.1	<i>Rabphilin</i> se expresa en el corazón de <i>Drosophila</i>	76
2.3.2	La interferencia de la expresión de <i>Rph</i> en los cardiomiocitos y los nefrocitos altera la estructura del corazón.	78
2.3.3	La interferencia de la expresión de <i>Rph</i> en los cardiomiocitos y los nefrocitos causa cardiomiopatía y reducción de la vida media.	79
2.3.4	Silenciamiento de la expresión de <i>Rph</i> solo en nefrocitos provoca un aumento en el diámetro diastólico y reducción de la vida media.	81
2.4	Discusión.....	83
CAPÍTULO 3	91
Rab 3 y Rab 27 son necesarios para la función y la estructura de los nefrocitos y están implicados en nefropatía diabética en <i>Drosophila</i>.....		
3.1	Introducción.....	91
3.2	Material y métodos	92

3.2.1. Líneas de <i>Drosophila</i>	92
3.2.2. Cuantificación del volumen y el número de nefrocitos	92
3.2.2. Inmunofluorescencia.....	93
3.2.3. Ensayo de toxicidad.....	93
3.2.4. Análisis de la supervivencia de <i>Drosophila</i>	93
3.2.5. Análisis <i>in vivo</i> de la filtración y la captación de moléculas de dextrano	94
3.2.6. Cuantificación de niveles de transcritos mediante PCR en tiempo real.	94
3.2.7. Ensayos de luminiscencia y fluorescencia.....	94
3.2.8. Análisis de las estructuras celulares del nefrocito de imágenes tomadas con microscopio electrónico de transmisión (TEM)	95
3.3 Resultados	95
3.3.1 Las proteínas Rab 3 y Rab 27 son necesarias para el mantenimiento del estado funcional de los nefrocitos pericárdicos.	95
3.3.2 La disfunción de las proteínas Rab en los nefrocitos altera el tráfico vesicular y la reabsorción molecular de los nefrocitos pericárdicos.	100
3.3.3 Las proteínas Rab son necesarias para la integridad de los ND y los canales laberínticos de los nefrocitos pericárdicos de <i>Drosophila</i>	103
3.3.4 El papel de las proteínas Rab en un modelo de nefropatía diabética en <i>Drosophila</i>	105
3.4 Discusión.....	109
CAPÍTULO 4	117
El silenciamiento de Rabphilin sensibiliza a estrés hiperglucémico: caracterización del modelo en <i>Drosophila</i> y rastreo de fármacos.....	117
4.1 Introducción.....	117
4.2 Material y Métodos	118
4.2.1. Líneas de <i>Drosophila</i>	118
4.2.2. Preparación de medio de cultivo con fármacos.....	118
4.2.3. Siembra de embriones con COPAS™ FP Flow Cytometer.....	118
4.2.4. Ensayo de luminiscencia.....	118
4.2.5. Análisis estadístico	119
4.3 Resultados	119
4.3.1 Generación de la línea recombinante <i>Sns-Gal4>UAS-IR-Rph:luc</i>	119
4.3.2 Cribado farmacológico	121
4.4 Discusión.....	124
DISCUSIÓN GENERAL	131

CONCLUSIONES	140
REFERENCIAS.....	144
ANEXO	159

RESUMEN

La enfermedad renal crónica (ERC) es una de las enfermedades más prevalentes en la actualidad, con un 10 % de personas que la sufren en todo el mundo. La aparición de la enfermedad puede deberse a diferentes causas como la diabetes, hipertensión, estado del sistema inmune y genéticas, siendo la hiperglucemia una de las más comunes y responsable de la mayoría de los casos. Esto convierte a la nefropatía diabética en la causa más frecuente de enfermedad renal en etapa terminal (ESRD) en la mayoría de los países.

La ERC es progresiva y el tratamiento sólo logra enlentecer su progresión, pero no revertirla. De ahí la necesidad de identificar mecanismos implicados en el daño renal y de encontrar posibles tratamientos.

Estudios anteriores mostraron la posible implicación del complejo *Rab-Rabphilin* en enfermedades proteinúricas. En éstos, se describió la localización y la alteración de la expresión de estas proteínas. Además, otros autores mostraron que presentar un determinado polimorfismo del gen *Rabphilin* aumentaba el riesgo de padecer albuminuria. A pesar de que se dispone de esta información, todavía se desconoce el papel de este complejo en el sistema renal y su papel en el desarrollo de la ERC.

Para contribuir al entendimiento de la función de este complejo en las enfermedades renales, la presente tesis titulada “Papel del complejo de proteínas *Rab-Rabphilin* en un modelo de daño renal en *Drosophila*”, se centró en determinar la función del complejo formado por proteínas Rab GTPasas, Rab 3 y Rab 27, y su efector *Rabphilin* en un modelo de daño renal. Además, en el mismo modelo, también se abordó el estudio de la afectación cardíaca, el papel del complejo *Rab-Rabphilin* en un modelo de nefropatía diabética y la búsqueda de fármacos que puedan revertir los procesos del daño renal.

Los nefrocitos de *Drosophila*, que son las células encargadas de filtrar, metabolizar y eliminar moléculas presentes en la hemolinfa, poseen gran homología funcional, estructural y molecular con los podocitos de mamíferos. Esta gran similitud entre ambos tipos celulares permite usar a la mosca como modelo para el estudio de enfermedades renales.

En el primer capítulo de este trabajo describimos que *Rph*, además de estar implicado en el transporte vesicular en los nefrocitos, también contribuye al mantenimiento del estado diferenciado de los mismos. En este apartado, determinamos cómo niveles bajos de *Rph* provocaron una disrupción en las funciones de filtración y reabsorción de moléculas llevadas a cabo por los

nefrocitos. Concretamente, la falta de *Rph* promovió la aparición de modificaciones citoesqueléticas que condujeron a alteraciones estructurales (desorganización de la membrana basal y ausencia de canales laberínticos) y la infraexpresión de genes esenciales como *Sns* y *Cubilin* que tuvieron como efecto una disfunción del tráfico vesicular y pérdida del estado diferenciado de los nefrocitos.

El capítulo 2 se abordó con el objetivo de determinar la afectación del corazón debido a los bajos niveles de *Rph*, tanto en los nefrocitos como en conjunto con los cardiomiocitos. Determinamos que *Rph* también está presente en los cardiomiocitos. Los resultados mostraron el papel relevante de *Rph* en el sistema cardiaco. La falta de expresión de *Rph* en este órgano provocó anomalías en la disposición de miofibrillas transversales, un mayor diámetro diastólico y sistólico y una disminución del grosor de las paredes del corazón. La falta de la expresión de *Rph* exclusivamente en los nefrocitos no resultó en una desorganización de las fibras cardíacas ni en cardiopatía. No obstante, se apreció un aumento en el diámetro diastólico y una reducción de la vida media. Estos resultados indican el efecto a distancia entre dos sistemas distintos.

En el tercer capítulo de este trabajo se demostró que las proteínas Rab son esenciales para la función y el mantenimiento de los nefrocitos. Al igual que la interferencia en la expresión de *Rph*, la alteración de la función de las proteínas Rab provocó cambios en la expresión de genes específicos y esenciales, *Sns* y *Kirre*, para el mantenimiento y función de las células, lo que además se vio apoyado por la perturbación de las estructuras subcelulares típicas de los nefrocitos, la hendidura de filtración y los canales laberínticos. Por otra parte, se estudió el papel del complejo *Rab-Rabphilin* en un modelo de daño renal inducido por hiperglucemia (modelo de nefropatía diabética). Los resultados mostraron que *Rph* y Rab 3 podrían tener un papel relevante en la aparición y progresión de la nefropatía diabética.

En el último capítulo de esta memoria se describe el rastreo químico llevado a cabo con un modelo de daño renal que combinaba la interferencia de la expresión de *Rph* con niveles de hiperglucemia constantes. En total se testaron 1200 compuestos procedentes de la quimioteca Prestwick, de los cuales 48 mostraron tener una regulación positiva de la expresión de *Sns*. Uno de estos compuestos, el ácido retinoico, demostró recuperar las alteraciones estructurales y funcionales en el modelo con falta de actividad de *Rph* (descrito en el capítulo 1).

Los resultados presentados en esta tesis respaldan la hipótesis de que el complejo *Rab-Rabphilin* tiene un papel importante en la función de las células que forman parte del sistema excretor de *Drosophila*. Dada la alta similitud entre los podocitos y los nefrocitos, esto apoyaría la idea de que este complejo es relevante en el establecimiento de la enfermedad renal. Además, los datos

confirman la relevancia de la función de los nefrocitos en la función cardíaca, es decir, estos resultados sugieren que existe un efecto no autónomo a distancia entre ambos tejidos. Finalmente, en este trabajo se ha descrito al ácido retinoico como posible fármaco para detener y revertir la progresión del daño renal en un modelo de mosca.

ABREVIACIONES

A

AgNO₃: nitrato de plata.

AI: *arrhythmia index*; arritmia.

AMN: Amnionless

B

Bcd: *bicoid*.

BM: *basement membrane*; membrana basal.

BSA: *bovine serum albumin*; suero bovino fetal.

C

CA: *constitutive active*; activadora constitutiva.

Cubn: *Cubilin*.

CD2AP: *CD2-associated protein*.

D

DI: *diastolic Interval*; intervalo diastólico.

DM1: diabetes mellitus de tipo 1.

DM2: diabetes mellitus de tipo 2.

DN: *dominant negative*; dominante negativa.

Duf: *Dumbfounded*.

E

ECV: enfermedad cardiovascular.

EDD: *end diastolic diameter*; diámetro diastólico.

ERC: enfermedad renal crónica.

ESD: *end systolic diameter*; diámetro sistólico

ESRD: *end-stage renal disease*; enfermedad renal en etapa terminal.

F

FG: filtrado glomerular.

FS: *Fractional Shortening*; fracción de eyección.

G

GCNs: *garland cell nephrocytes*.

GFP: *green fluorescent protein*.

GSFS: glomerulosclerosis focal y segmentaria.

H

HP: *heart period*; periodo cardiaco.

I

IC: insuficiencia cardiaca.

K

Kirre: *Kin of irre*.

Klf15: *Krüppel-Like factor 15*.

N

ND: *nephrocyte diaphragm*; hendidura de filtración del nefrocito.

NS: *nephrotic syndrome*, síndrome nefrótico.

O

Oe: esófago

P

PBS: *phosphate buffered saline*; tampón fosfato salino.

PFA: paraformaldehído.

PN: *pericardial nephrocyte*; nefrocito pericárdico.

R

RA: *retinoic acid*; ácido retinoico.

Rph: *Rabphilin*.

RT-PCR: *reverse transcription polymerase chain reaction*; reacción de retrotranscripción en cadena de la polimerasa.

S

SD: *Slit diaphragm*. Hendidura de filtración del podocito.

SI: *systolic interval*; intervalo sistólico.

SOHA: *Semi-automated optical heartbeat analysis*.

SRNS: *steroid resistant nephrotic syndrome*; síndrome nefrótico resistente a esteroides.

Sns: *Stick and Stones*.

STZ: streptozotocin.

T

TEM: *Transmission Electron Microscopy*; microscopía electrónica de transmisión.

U

UAS: *upstream activating sequence*.

Z

ZO-1: *Zonula occludens*.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. El sistema renal humano

Los órganos encargados del proceso de filtración de sustancias tóxicas, moléculas y proteínas en humanos son los riñones¹. Estos se sitúan en la parte baja de la espalda a ambos lados de la columna vertebral y tienen forma de judía. En el riñón se pueden distinguir dos partes, la corteza renal donde se encuentra aproximadamente el 75 % de los glomérulos y los túbulos proximales y distales (Figura 1). Su función principal es la filtración, reabsorción y secreción de moléculas presentes en la sangre^{1,2}. La otra parte del riñón es la médula que está formada por las pirámides renales, que son formaciones cónicas cuyo vértice se abre en cavidades en forma de copa llamadas cálices renales que convergen en el uréter (Figura 1)².

La nefrona, la unidad funcional del riñón, es el conjunto de glomérulo, cápsula y túbulos renales. Se estima que hay aproximadamente 1 millón de estas unidades funcionales en un riñón humano³. La mayor parte de las nefronas se encuentran en la zona cortical mientras que la porción del túbulo renal se encuentra en la médula renal (Figura 1)³.

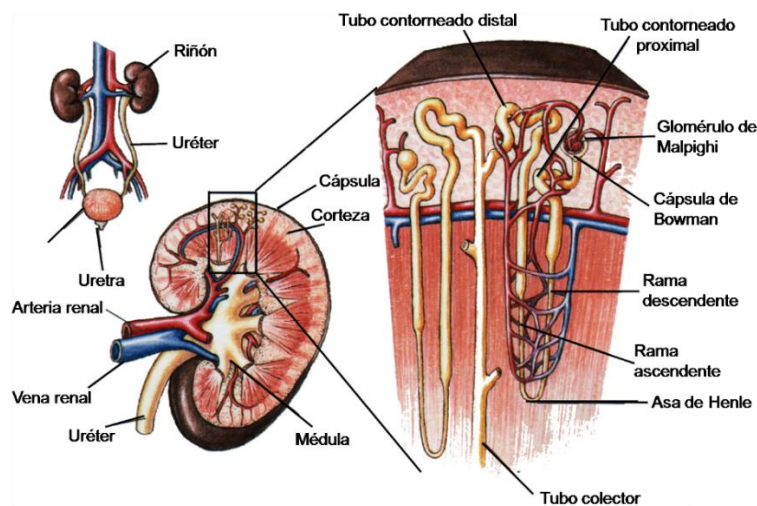


Figura 1. Ilustración del sistema renal humano. En el riñón se pueden distinguir dos partes: la médula y la corteza renal donde se encuentran los glomérulos.

El glomérulo está formado por una red de capilares rodeada por una envoltura externa en forma de copa llamada cápsula de Bowman. Los capilares glomerulares son capilares fenestrados, tienen poros que permiten que los fluidos y moléculas pequeñas como iones y azúcares salgan de la sangre

y, que proteínas, células, complejos proteicos y lípidos que exceden el tamaño del poro, así como iones de calcio (Ca^{2+}) sean retenidas y que no pasen el epitelio fenestrado³.

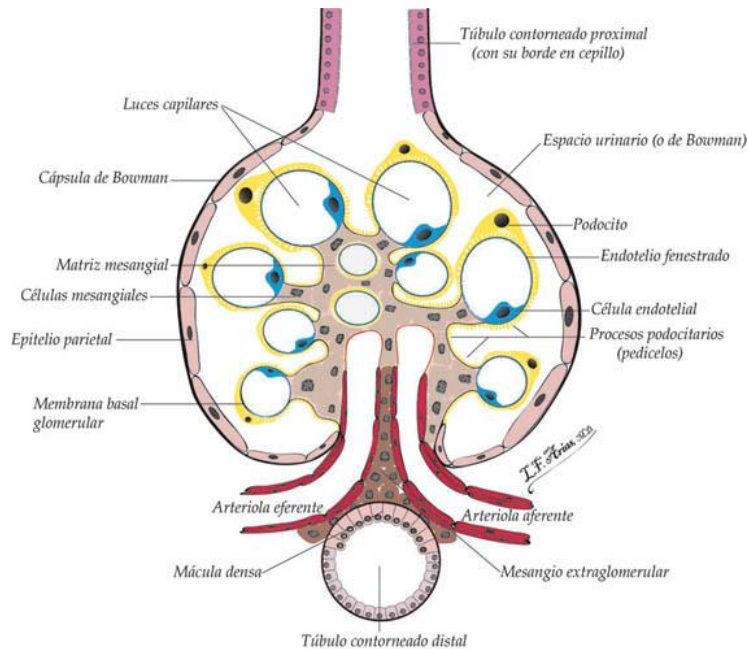


Figura 2. Esquema del glomérulo renal humano. Las células endoteliales (en azul) forman el epitelio fenestrado que junto con la membrana basal glomerular y los podocitos (en amarillo) constituyen la barrera de filtración glomerular. Imagen tomada de kidneypathology.com

Alrededor del capilar encontramos unas células altamente especializadas, llamadas podocitos, las cuales forman lo que se conoce como hendidura de filtración que constituye otra barrera de filtración de moléculas (Figura 2). Estas células forman un diafragma de filtración con unos poros de aproximadamente 40 nm de diámetro por los cuales pasan las moléculas que van a ser desechadas por la orina. Las principales proteínas que forman la hendidura de filtración son Nephryn y NEPH1, estas proteínas conforman el poro mediante interacciones homo- y heterotípicas (Figura 3). En conjunto, el epitelio, la membrana basal y la hendidura de filtración de los podocitos forman la barrera de filtración renal que es esencial para la función glomerular⁴ (Figura 2 y 3). La alteración de una de ellas puede provocar la aparición de una enfermedad renal.

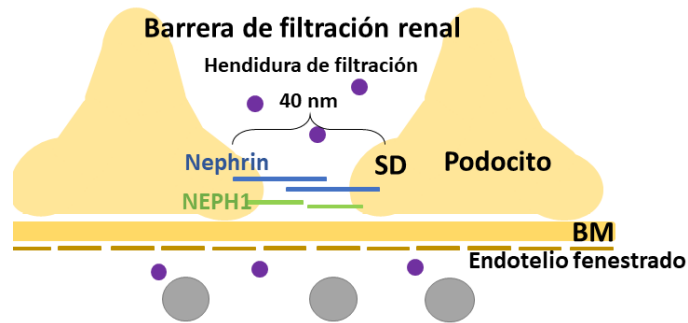


Figura 3. Esquema de la barrera de filtración renal. El endotelio fenestrado, la membrana basal (BM) y la hendidura de filtración forman la barrera de filtración renal. Nephryn y NEPH1 sellan el poro de la hendidura de filtración de 40 nm de diámetro que constituye una barrera selectiva de moléculas por su tamaño molecular. La BM es una barrera selectiva de moléculas dependiente de carga.

2. La enfermedad renal

La enfermedad renal es una de las enfermedades más prevalentes en la actualidad. Aproximadamente, el 10% de la población presenta fallo renal crónico y 70 millones de europeos padecen disfunción renal, por lo que presentan un alto riesgo en ser dependientes de diálisis o trasplante de riñón⁵; esto provoca una gran morbilidad y mortalidad en la población. Actualmente, cuando se padece una enfermedad renal crónica de estado avanzado, se recurre a un tratamiento de diálisis o trasplante, de ahí la necesidad de encontrar terapias y estudiar genes implicados y mecanismos que conllevan a la aparición y progresión de la enfermedad renal.

La enfermedad renal crónica (ERC) se define como la disminución de la función renal, expresada por un $FG < 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$, o como la presencia de daño renal de forma persistente durante al menos 3 meses⁶. La presencia de ERC no solo implica tener una gran probabilidad de progresión a una enfermedad terminal sino también de poseer un elevado riesgo cardiovascular con consecuencias fatales⁷⁻⁹. Una vez establecida la ERC, esta es progresiva y el tratamiento solo logra enlentecer la progresión de la enfermedad, pero no revertirla. De ahí la necesidad de conocer mecanismos y rutas que permitan identificar marcadores implicados en el daño renal para así establecer acciones que permitan detener, enlentecer o revertir la progresión del daño renal y sus consecuencias.

La aparición y desarrollo de la ERC puede ser debida a una lesión de las estructuras renales y células que forman parte del sistema renal como, por ejemplo, los podocitos^{10,11}. Los podocitos, como se ha explicado anteriormente, son células altamente especializadas que recubren la membrana basal

y que constituyen la barrera de filtración de moléculas (Figura 2 y 3). La hendidura de filtración de estas células se forma mediante las interacciones entre las membranas de los podocitos adyacentes, lo que da lugar a una barrera formada por poros de 40 nm de diámetro que permite la filtración dependiente del tamaño de las moléculas^{12,13} (Figura 3). La principal lesión podocitaria implica una alteración del citoesqueleto de actina¹⁴⁻¹⁶, que implica la desestructuración y la desregulación de la función de filtración, dando como resultado el inicio de la proteinuria. La aparición de proteinuria es una de las características que define a la enfermedad renal, la presencia de ésta puede hacer que se acelere la progresión de un daño renal que conduce al fallo del órgano¹⁷, los mecanismos que conducen a este último resultado todavía son desconocidos.

Con el daño a las estructuras del glomérulo, se producen cambios como, por ejemplo, la pérdida de la hendidura de filtración y la perturbación de rutas de señalización y vías metabólicas que resultan irreversibles^{18,19}. Estos cambios acaban provocando la muerte celular, senescencia y desprendimiento de podocitos, que conduce a un fallo renal irreversible. Sin embargo, también existe desprendimiento de podocitos que no tiene que ir precedido de muerte celular, sino de un proceso de desdiferenciación, pudiéndose encontrar podocitos viables en la orina²⁰.

La aparición del daño en los podocitos y demás estructuras renales puede ser debida a diferentes causas como la diabetes²¹, hipertensión^{22,23}, estado del sistema inmune^{24,25} y genéticas²⁶⁻²⁹. Siendo la diabetes y la hipertensión arterial las 2 causas más comunes y responsables de la mayoría de los casos de enfermedad renal crónica. Además de estas causas hay otras variantes causantes del fallo renal que todavía se desconocen. Las mutaciones o polimorfismos en genes específicos de los podocitos han recibido una alta atención por ser una de las grandes causas de aparición de fallo renal. Además, los distintos polimorfismos encontrados en estos genes podrían explicar la diferencia entre pacientes en cuanto a la progresión de la enfermedad renal. Un ejemplo de genes mutados serían ACE1, FRMD3 y SCL2A1 asociados con nefropatía diabética^{30,31}, nefrina y podocina en el síndrome nefrótico^{27,32}, o alfa-4-actinina³³, MYH9^{34,35} y TRPC-6³⁶ en la glomeruloesclerosis focal y segmentaria.

3. El sistema excretor de *Drosophila melanogaster*

La función del sistema excretor de los organismos multicelulares es fundamentalmente la misma; eliminar metabolitos y toxinas presentes en el sistema circulatorio y mantener la homeostasis de agua, el balance iónico y el ácido-base (regulación del pH)^{1,2}. Para que el sistema excretor pueda

realizar todas sus funciones requiere de un sistema de filtración y un sistema de reabsorción que estén en contacto con los fluidos del organismo, en el caso de los vertebrados, en contacto con la sangre; en el caso de *Drosophila* con la hemolinfa^{37,38}.

Los órganos del sistema excretor de los vertebrados están formados por unas células altamente especializadas que se encargan de los procesos de filtración o ultrafiltración. Producen un filtrado primario, que es modificado por procesos de reabsorción en los túbulos epiteliales, hasta que es excretado con los productos tóxicos que estaban presentes en el organismo. En el caso de los organismos invertebrados, básicamente las funciones de filtración y reabsorción están ligadas a una misma célula, órgano o estructura³ (Figura 4). Este es el caso del organismo modelo que se ha utilizado en el presente trabajo, *Drosophila melanogaster*, cuyos nefrocitos son los encargados de filtrar y reabsorber las moléculas que circulan en la hemolinfa^{37,38} (Figura 4).

El sistema excretor de *Drosophila* está formado por los nefrocitos y los túbulos de Malpighi (Figura 4 A). Los nefrocitos se pueden distinguir por su localización en el animal; los de Garland³⁹, binucleados, están situados alrededor del esófago y los nefrocitos pericárdicos que se sitúan a lo largo y a ambos lados del corazón tubular (Figura 4 A y B).

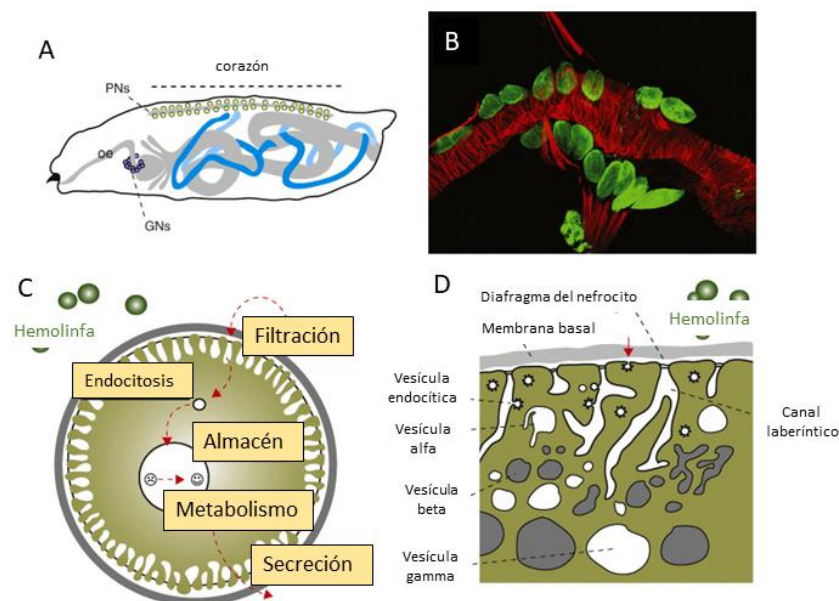


Figura 4. Sistema excretor de *Drosophila melanogaster*. A.

En azul se representan los túbulos de Malpighi de la larva de *Drosophila*. Los nefrocitos pericárdicos (PNs) se sitúan a lo largo del corazón y los nefrocitos de Garland (GNs) se localizan alrededor del esófago (oe) de la larva. B. Imagen confocal de nefrocitos pericárdicos (en verde) a lo largo del corazón

(en rojo). C. Esquema de un nefrocito con las funciones que realiza: filtración, endocitosis, almacenamiento, procesamiento y secreción de moléculas presentes en la hemolinfa (esferas verdes). D. Representación de las estructuras celulares corticales de un nefrocito: membrana basal, hendidura de filtración y canales laberínticos. Se muestran las vesículas endocíticas y las diferentes clases de vacuolas. Imagen modificada de Denholm et al.⁴⁰

3.1 Nefrocitos

Los nefrocitos fueron descritos por primera vez por Kowalevsky⁴¹, el cual los denominó “*storage kidneys*” por su capacidad de secuestrar y almacenar moléculas presentes en la hemolinfa. En los años 60 se describió por primera vez la estructura de los nefrocitos^{42,43} y años más tarde Crossley et al.⁴⁴ mostró más detalladamente las estructuras características de estas células y su función de filtración.

Los nefrocitos pericárdicos derivan del mesodermo cardiaco embrionario, de ahí que también se denominen células pericárdicas. Durante el estadio larvario y adulto permanecen entre 30-40 nefrocitos pericárdicos^{45,46} de 120 nefrocitos iniciales, es decir, solo el 25 % del número inicial de células permanecen en el adulto^{47,48}. Todavía se desconoce a qué es debida esta pérdida del número de nefrocitos. No obstante, se conoce que en la diferenciación, desarrollo y mantenimiento del nefrocito, se requiere del factor *Krüppel-Like Factor 15*, *dKlf15*. *dKlf15* es el ortólogo del gen *KFL15* de mamíferos, que también juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento del podocito⁴⁹⁻⁵¹.

Aunque sabemos que los nefrocitos son importantes para la detoxificación de compuestos presentes en la hemolinfa se desconoce parte de sus funciones, ya que cuando se eliminan en moscas adultas, por la supresión de la función de *dKlf15*, la supervivencia de estas moscas no se ve comprometida, aunque sí la de las larvas. No obstante, cuando los nefrocitos están presentes pero no son funcionales, en las moscas adultas no sólo está comprometida la supervivencia en condiciones normales sino también en condiciones de estrés tóxico⁴⁹. Estos descubrimientos sugieren que la función de los nefrocitos es más relevante en larvas que en adultos y que es más perjudicial la permanencia de nefrocitos defectuosos que su ausencia. Otros grupos mostraron que, aunque la supervivencia en moscas adultas no está comprometida por la falta de nefrocitos pericárdicos sí tiene consecuencias ya que, estas moscas presentan alteración de algunos parámetros cardíacos⁵². Esto indica la asociación del sistema renal con el sistema cardiaco en *Drosophila* al igual que ocurre en humanos. Es conocida la directa asociación entre el desarrollo de una enfermedad cardiovascular con el desarrollo y progresión de la enfermedad renal crónica y ambos pueden ser causa y consecuencia uno del otro⁵³.

Los nefrocitos son funcional, estructural y molecularmente muy similares a los podocitos de mamíferos y, por tanto, de humanos (Figura 5)^{38,39,54,55}. Una prueba más de esto es que ambos tipos

celulares responden de forma similar a tratamientos farmacológicos, por ejemplo, la administración de puromicina⁵⁶ y protamina sulfato³⁹ disgregan o destruyen la barrera de filtración.

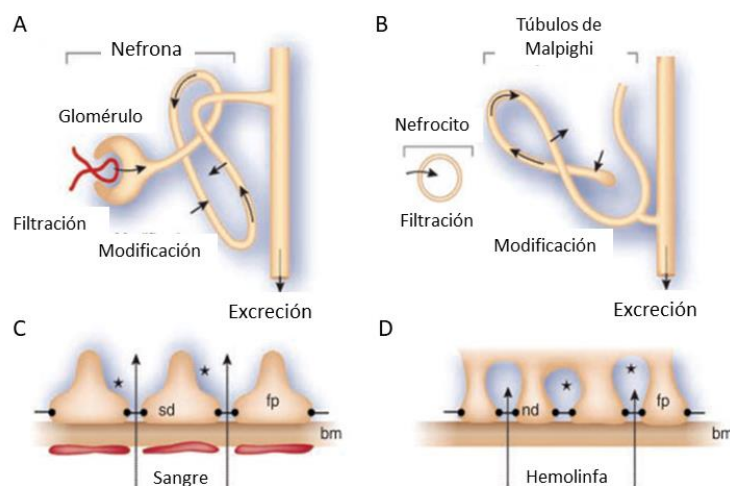


Figura 5. Los nefrocitos de *Drosophila* son funcional, estructural y molecularmente similares a los podocitos de mamíferos. Esquema del sistema excretor humano (A) y de *Drosophila* (B) y sus funciones. Representación de la barrera de filtración de mamíferos (C) y de *Drosophila* (D). sd y nd representan la hendidura de filtración de podocitos y nefrocitos, respectivamente. fp representa el citoesqueleto de las células y bm la membrana basal. Las flechas marcan la dirección del filtrado de las moléculas presentes en sangre o hemolinfa. Los asteriscos (*) representan el espacio urinario en C y el canal laberíntico en D. Imagen modificada de Simons M et al.³⁷.

3.1.1 Función de los nefrocitos.

A nivel funcional, los nefrocitos realizan procesos de filtración al igual que los podocitos, pero también se caracterizan por su función endocítica o de reabsorción, típica de las células del túbulo proximal de mamíferos. Así pues, los nefrocitos agrupan en una sola célula funciones que en mamíferos se realizan en tipos celulares físicamente separados (Figura 5). Los nefrocitos con su actividad filtradora y endocítica regulan la composición de la hemolinfa⁵² (Figura 4 y 5).

A parte de la filtración de moléculas presentes en la hemolinfa; el nefrocito también detoxifica mediante procesos de endocitosis o reabsorción. Los nefrocitos son células con una alta actividad endocítica, por lo que han sido y son ampliamente utilizados para el estudio de la endocitosis⁵⁷⁻⁶¹. Esta endocitosis ocurre mayoritariamente dentro de los canales laberínticos cuando las moléculas han sido filtradas a través de la hendidura de filtración del nefrocito, conocido como *nephrocyte*

diaphragm (ND). La otra parte de la endocitosis ocurre directamente a través de la membrana de la célula. Las moléculas endocitadas en los canales laberínticos son reconocidas por el complejo formado por las proteínas dCubilin (cubn) y dAnmionless (AMN). Los homólogos de estas proteínas en humanos cubilin y AMN se localizan en las células del túbulo proximal y median la reabsorción de moléculas presentes en el fluido que está en el túbulo y que formará la orina^{62,63}, es por esto por lo que el nefrocito también es considerado como modelo para el estudio y caracterización de enfermedades del túbulo proximal^{63,64}. Las vesículas endocíticas con los cargos procedentes del canal laberíntico son almacenadas o metabolizadas en los lisosomas para su excreción o reciclado. No obstante, se desconoce el mecanismo de reconocimiento del cargo y su destino. Un compuesto que no puede ser destruido en los nefrocitos es almacenado intracelularmente, de forma que deja de ser tóxico ya que no está presente en la hemolinfa.

Para determinar si hay alguna alteración en la función del nefrocito, es posible recurrir a la utilización de trazadores. Los trazadores son moléculas o proteínas fácilmente visibles que son filtradas o endocitadas y almacenadas por los nefrocitos. La elección de los trazadores depende de lo que se quiere estudiar en el nefrocito: filtración o endocitosis. Pues algunos trazadores son captados por el receptor Cubn, mientras que otros no necesitan del reconocimiento de éste^{65,66}. Estos trazadores pueden ser expuestos a los nefrocitos mediante una estrategia *ex vivo* o usar una estrategia *in vivo* con proteínas endógenas marcadas con fluoróforos⁵⁵. Moléculas de dextrano^{38,54,55}, polímeros de carbono de diferente tamaño marcados con fluoróforos al igual que AgNO₃ son ampliamente utilizados. También se utilizan derivados del GFP como el EMD que se expresan bajo el control de un promotor de un gen que codifica para una proteína secretable⁵⁵, albumina³⁹, avidina⁶¹, aglutinina de trigo⁵⁷ y peroxidasa “Horseradish”, HRP⁴⁴.

Otras formas para determinar la funcionalidad de las células de forma indirecta son los ensayos de supervivencia. Estos ensayos se realizan en condiciones normales y en presencia de toxinas que tras ser ingeridas permanecen en la hemolinfa para ser captadas por los nefrocitos⁶⁷. A pesar de ser ampliamente utilizados, estos estudios resultan difíciles de interpretar ya que, como se ha explicado antes, las moscas sin nefrocitos no tienen una vida media reducida con respecto a las moscas control.

3.1.2 Estructura y morfología de los nefrocitos

A nivel estructural, los nefrocitos también poseen una alta similitud con los podocitos de mamíferos ya que ambos tipos celulares presentan una membrana basal que permite el paso de moléculas dependiendo de su tamaño y carga, excluyendo moléculas de alto peso molecular y/o con una alta carga negativa. También poseen hendiduras de filtración o poros de filtración (*nephrocyte diaphragm*, *ND*), de entre 30-40 nm de ancho (Figura 6). Estos poros permiten el paso de moléculas dependiendo de su tamaño, siendo el tamaño máximo de paso de aproximadamente 10-12 nm^{38,40,44,54,68}. Esto es bien conocido ya que partículas de dextrano de 10-kDa (10.6 nm de diámetro) pasan a través de esta hendidura mientras que moléculas de dextrano de 500-kDa (93 nm de diámetro) no consiguen pasar a través de este poro³⁸. El tamaño límite para que una molécula consiga pasar a través de los poros o del ND (o hendidura de filtración del podocito, *slit diaphragm*, *SD*) en el caso de mamíferos, es para ambos tipos celulares de 70-kDa⁵⁵. Las moléculas que son muy grandes y que no pasan a través del ND/SD no compiten por los receptores que hay en los canales laberínticos³⁹. Las moléculas que logran ser filtradas a través de la hendidura de filtración pasan a unas estructuras formadas por invaginaciones de la membrana basal del nefrocito, los canales laberínticos. En estos canales las moléculas son endocitadas para su procesamiento (Figura 6).

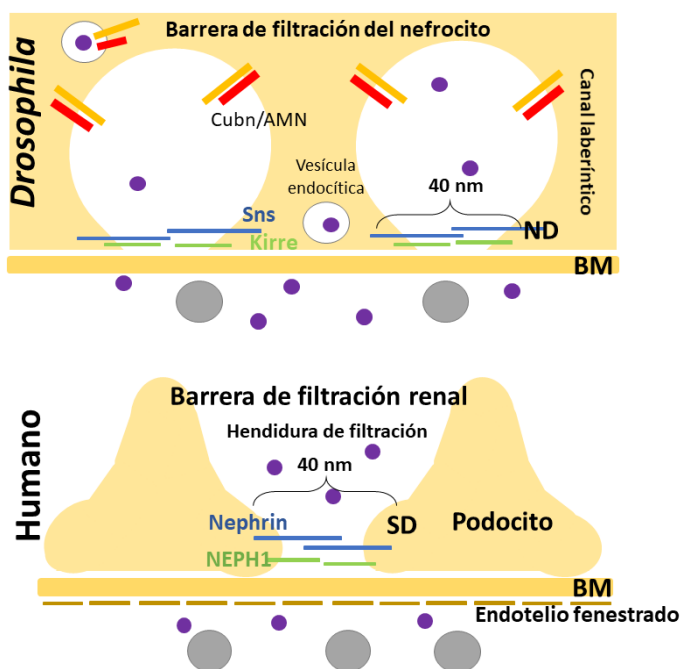


Figura 6. Comparación entre la barrera de filtración renal de *Drosophila* y humana.

Los podocitos y los nefrocitos son estructuralmente muy similares. Ambos tipos celulares poseen un diafragma de filtración (ND en *Drosophila* y SD en humanos) de aproximadamente 40 nm de diámetro, formada por proteínas homólogas, una membrana basal y un espacio urinario o canal laberíntico donde se lleva a cabo la endocitosis de moléculas.

Uno de los aspectos por los que se creía que se diferenciaban los nefrocitos y los podocitos es la polaridad que presentan estos últimos. Sin embargo, algunos estudios apuntan a que los nefrocitos también podrían tener polaridad apico-basal⁶⁹. Esto se explica porque Crumbs, un marcador apical

de los podocitos se encuentra en la membrana de los canales laberínticos de los nefrocitos, mientras que las integrinas, marcadores de la parte basal de las células, se sitúan en los ND. Así pues, aunque los nefrocitos son células esféricas podrían tener una polaridad al igual que los podocitos. La conservación de este aspecto podría ser, al igual que en los podocitos, esencial para el mantenimiento de la función del nefrocito.

Una de las técnicas complementaria a la observación y cuantificación de trazadores es el análisis con microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las imágenes con TEM permiten conocer si las estructuras que están relacionadas con los procesos de filtración y endocitosis se conservan. Es fácil distinguir los ND/SD y los canales laberínticos. Las imágenes tomadas a gran aumento permiten medir incluso el tamaño del poro formado por sns/kirre o nephrin/Neph1 en *Drosophila* y mamíferos, respectivamente. No obstante, hay que tener en consideración que un corte no sea perpendicular ni tangencial a la superficie del nefrocito ya que puede dar resultados equívocos debido a que las estructuras, en esa orientación, no son fácilmente distinguibles⁵.

3.1.3 Características moleculares de los nefrocitos

A nivel molecular, múltiples genes específicos de nefrocitos y sus proteínas presentan alta homología con las proteínas humanas (Tabla 1). Así pues, los genes que codifican para las proteínas que forman parte de la hendidura de filtración en el nefrocito, Stick-and-stones (Sns) y Kirre o Dumbfounded (Duf), proteínas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, poseen una alta homología con las proteínas humanas Nephrin (codificada por el gen NPHS1) y NEPH1 (codificada por el gen KIRREL), respectivamente. Los dominios extracelulares de estas proteínas forman interacciones homotípicas y heterotípicas para dar lugar al poro del nefrocito o del podocito, conocido también como hendidura de filtración. Alteraciones en estos genes, que tienen como consecuencia la ausencia de estas interacciones, dan lugar a enfermedades en humanos en las cuales los SD están ausentes y por consiguiente se pierde la función de filtración de las células^{27,38}. Esto ocurre, por ejemplo, en la enfermedad NPHS1 (nefrosis), la cual se caracteriza por la aparición de proteinuria y progreso a un fallo renal que conlleva finalmente a la muerte. Nephrin y NEPH1 interaccionan por sus dominios intracelulares con otras proteínas, CD2-associated protein (CD2AP)^{70,71} y con zonula occludens-1 (ZO-1)⁷², los ortólogos de Cindr y pyd en *Drosophila*, respectivamente. Otra de las proteínas que interacciona con las anteriores es podocin (o NPHS2), el ortólogo Mec2 en *Drosophila*, involucrada en la formación de microdominios en la membrana^{32,73}.

Así pues, la gran homología de las proteínas y sus interacciones entre el podocito humano y el nefrocito en *Drosophila*, explica la gran similitud funcional entre ambos tipos celulares y permite usar a la mosca como modelo para el estudio de múltiples enfermedades renales.

Gen humano	Ortólogo de <i>Drosophila</i>	Función	Localización celular	Patología Renal
NPHS1	Sns	Filtración	Hendidura de filtración	SRNS
NPHS2	Mec2	<i>Linker</i>		SRNS
CD2AP	Cindr	Adaptador		SRNS
PTPRO	Ptp10D	receptor		SRNS
TRPC6	Trpgamma	Canal de calcio		SRNS
MYH9	Zip	Miosina motora	Citoesqueleto de actina	SRNS
MYO1E	Myo61F			SRNS
ACTN4	Actn	Organización actina		SRNS
INF2	Form3			SRNS
SYNPO	CG1674			NS
ANLN	Scra			SRNS
KANK1	Kank	Regulación actina		SRNS
KANK2				SRNS
KANK4				SRNS
ARHGAP24	RhoGAP92B	Señalización		SRNS
ARHGDIA	RhoGDI			SRNS
LMX1B	CG32105	Factor de transcripción	Núcleo	SRNS
SMARCAL1	Marcal1			SRNS
PAX2	Sv			NS
ESF3	E2f			NS
NXF5	Sbr	Exportación RNA		NS
ZMPSTE24	Ste24s	Procesamiento lamina A		NS
LMNA	Lam	Lamina		NS
CUBN	Cubn	Endocitosis	Membrana plasmática	IGS
AMN	Amn			IGS
SCARB2	Emp	Proteólisis	Lisosoma	SRNS
PMM2	CG10688	Glicosilación	Citosol	NS

ALG1	CG18012		Retículo endoplasmático	NS
COQ2	Coq2	Síntesis coenzima Q	Mitocondria	SRNS
COQ6	CG7277			SRNS
PDSS2	CG10585			SRNS
ADCK4	CG32649			SRNS
GPC5	Dally	Señalización	Membrana plasmática	NS
ITGA3	Mew	Adhesión		SRNS
ITGB4	Mys			SRNS
CD151	Tsp74F			NS
LAMB2	LanB1	Estructura membrana extracelular	Membrana extracelular	SRNS
COL4A3	Col4a1			Alport
COL4A4				Alport
COLA5				Alport

Tabla 1. Genes humanos específicos del sistema renal y los ortólogos de *Drosophila* implicados en enfermedades renales. Tabla modificada de Fu Y et al.⁶⁷

3.2 Túbulos de Malpighi

Los túbulos de Malpighi están formados por un epitelio de una sola capa de células. Podemos encontrar un tipo de células con una gran actividad de reabsorción en la parte más proximal del túbulo; y unas células denominadas secretoras que a su vez se dividen en dos tipos de células: las principales y las células estelares (Figura 7). Estas células secretoras se sitúan en la parte más distal del túbulo. Las células principales transportan cationes hacia el lumen y las células estelares median el movimiento del agua a través de acuaporinas y canales iónicos (Cl⁻)⁷⁴⁻⁷⁷. Estas estructuras son utilizadas como modelo para el estudio de enfermedades renales como la nefrolitiasis, que se caracteriza por la aparición de trozos de material sólido de fosfato y carbonato cálcico o úricas dentro del riñón.

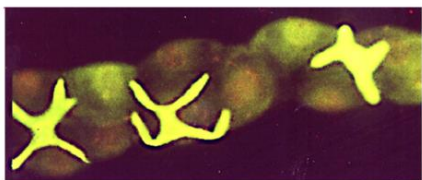
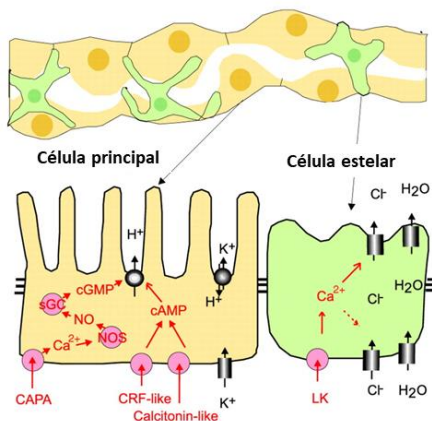


Figura 7. Imagen y esquema representativo de parte de los túbulos de Malpighi. Las células de color naranja representan las células principales, encargadas de transportar cationes hacia el lumen, y las células de color verde representan las células estelares, que median el movimiento de agua hacia el lumen. Imagen modificada de Dow J 2009⁷⁸.



4. Sistemas modelo para el estudio de enfermedades renales: *Drosophila melanogaster*.

Las alteraciones en el glomérulo son la causa más habitual o común que acaba provocando una enfermedad renal. La gran cantidad de perturbaciones que pueden afectar primariamente al glomérulo hace que sea difícil encontrar una terapia para todas las glomerulopatías. Por ello, se necesitan sistemas modelo para estudiar con más profundidad los aspectos que engloban a las causas de la enfermedad renal.

El ratón es el sistema modelo más empleado actualmente. No obstante, tiene una serie de limitaciones como son el elevado coste, la velocidad en la obtención de resultados y las políticas de bienestar animal y éticas. También se utilizan líneas de cultivo de podocitos. El principal problema del cultivo de podocitos es que éstos en condiciones *in vitro* no llegan a formar la estructura característica que poseen *in vivo*, es decir, no pueden formar las hendiduras de filtración⁷⁹. *Zebrafish* es otra opción para el estudio de las enfermedades renales ya que posee un glomérulo primitivo, pero la falta de tecnología y herramientas para el estudio en este animal modelo hace imprescindible buscar otros sistemas como *Drosophila*.

Drosophila melanogaster, aparte de las grandes similitudes que comparte con los podocitos, explicados anteriormente; presenta otro tipo de ventajas como: tiempos de generación cortos, bajo coste económico y alta progenie. Esto le da al modelo gran importancia en el campo de la

investigación de enfermedades renales. Además, los nefrocitos también comparten función con las células del túbulo proximal de mamíferos como es la reabsorción/endocitosis y expresan genes homólogos como *Cubilin* y *Amnionless*. Por ello, los nefrocitos no son solo modelo para el estudio de alteraciones podocitarias^{80,81}.

4.1 Los nefrocitos de *Drosophila* como modelo para el estudio de enfermedades renales.

Drosophila melanogaster comparte el 70 % de los genes humanos⁸². Esta similitud de genes entre las dos especies permite usar a la mosca como modelo para el estudio de enfermedades genéticas humanas.

Para el estudio de ciertos genes que podrían o están implicados en la aparición y/o desarrollo de la enfermedad renal crónica, se pueden emplear distintas técnicas que permiten crear modelos con ganancia o pérdida de función del determinado gen o construcción; estos procedimientos son: expresión de RNAi de genes candidatos, obtención de individuos con alelos nulos y la nueva tecnología CRIPR/Cas9. Para la expresión dirigida, en los nefrocitos, de genes o construcciones de interés, se utiliza el sistema *Gal4/UAS*.

El sistema *Gal4/UAS* permite expresar un gen o construcción de una manera dirigida en el espacio y en el tiempo. Por un lado, se genera una línea de *Drosophila* que contiene el transgén que se quiere expresar clonado aguas abajo de la secuencia *UAS* (*upstream activation sequence*), diana del factor de transcripción *Gal4*. Por otro lado, tenemos una línea que expresa bajo el promotor de un gen, de un tejido u órgano específico, el factor de transcripción *Gal4*. Al cruzar ambas líneas, *Gal4*, que sólo se expresa en el tejido de interés, se une a la secuencia *UAS* activando la expresión del constructo (Figura 8)^{83,84}.

Las líneas *Gal4* que más se utilizan para el estudio de enfermedades renales son: *Dorothy-Gal4*^{85,86}, *sns-GCN-Gal4*⁵⁴ y *Hand-Gal4*^{87,88}.

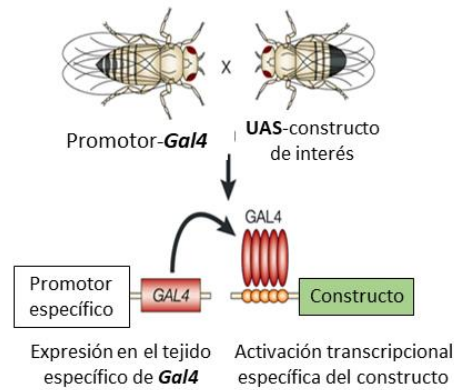


Figura 8. Esquema representativo de la expresión de un transgén de interés mediante el sistema *GAL4/UAS*.

Figura modificada de Muqit M 2002⁸⁹.

4.1.1 Ejemplos de enfermedades renales estudiadas en *Drosophila melanogaster*

En humanos, una mutación en un solo gen puede provocar la aparición, desarrollo y progresión de una enfermedad renal. Un ejemplo de ello es el síndrome nefrótico resistente a esteroides (en inglés *Steroid-resistant nephrotic syndrome, SRNS*)^{90,91} en el que la mutación de un solo gen es la causa de aproximadamente el 30 % de los casos^{90,92,93}. Hasta ahora, más de 50 genes están descritos como la causa de síndromes nefróticos monogénicos. Algunos de estos genes son *KANK*⁹⁴, *ARHGDI*⁹⁵, *ADCK4*⁹⁶, *SGPL1*⁹⁷, *Coq2*^{39,98,99} y *CUBN*⁸⁰. De estos genes se pueden encontrar homólogos en *Drosophila* por lo que se pueden estudiar los mecanismos de patologías renales causadas por éstos. Se ha demostrado que es posible usar a la mosca como modelo para el estudio de la nefropatía diabética. El modelo se consigue mediante la administración de una dieta hiperglucémica¹⁰⁰ durante un tiempo determinado. En el estudio que llevó a cabo Na J. et al 2015 con este modelo, se observó una disminución de la cantidad de proteína Sns, el ortólogo de Nephrin, que conlleva a una pérdida en la función filtradora del nefrocito. Este proceso ocurre de forma similar en los podocitos de pacientes diabéticos, lo que sugiere que ambos sistemas comparten mecanismos similares o al menos, algunas consecuencias. Además, estos resultados se validaron también en un modelo murino para esta enfermedad¹⁰⁰ lo que apoya el modelo en la mosca.

En cuando a las nefropatías asociadas a APOL-1, la falta de homología entre el gen APOL-1 humano y el mismo gen en los sistemas modelo dificulta el estudio de esta nefropatía. No obstante, cuando el alelo mutado humano es expresado en los nefrocitos de *Drosophila*, éstos presentan la disfunción característica de la enfermedad^{85,86}. Estos resultados se validaron también en un modelo murino¹⁰¹.

Los componentes de la membrana basal de los nefrocitos y los podocitos son sintetizados por las propias células. Así que, se cree que las proteínas de la hendidura de filtración, Sns y Kirre o Nephrin y Nephrin, en *Drosophila* y mamíferos respectivamente, pueden regular directa o indirectamente la composición de la membrana basal³⁷. Mutaciones en genes como alfa-4-actinina³³, TRPC-6³⁶ y MYH9³⁴ también se han asociado con la glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GSFS). La modificación de estos genes en *Drosophila* han permitido que ésta sea utilizada también como modelo para el estudio de la GSFS.

Por otra parte, los túbulos de Malpighi también se han utilizado como modelo para el estudio de enfermedades renales como nefrolitiasis^{102,103} y enfermedad del riñón poliquístico^{104,105}.

5. El complejo *Rabphilin-Rab* en el sistema renal de mamíferos y *Drosophila*

Como se ha comentado en apartados anteriores, mutaciones genéticas de genes específicos tienen un efecto directo en la filtración del podocito o en la reabsorción por parte de las células del túbulo proximal, esto tiene como consecuencia, entre otras cosas, la aparición de proteinuria, que es característico de la enfermedad renal y que puede desencadenar fallo renal^{55,67,106-108}.

Uno de estos genes que podría tener un papel importante en la función renal es *Rabphilin-3A* (*Rph-3A*)¹⁰⁹. Hasta la fecha, se ha descrito que en humanos, el gen *Rph-3A* codifica para una proteína cuya expresión se restringe a neuronas y podocitos¹¹⁰⁻¹¹³. En podocitos, aunque no ha sido ampliamente estudiada, se conoce que se sitúa alrededor de las vesículas que se encuentran cerca de la zona de filtración, lo que sugiere su implicación en este proceso¹¹⁰.

Rph-3A es uno de los efectores de la familia de proteínas Rab. En sistema nervioso, los complejos formados por *Rph-3A* y las Rabs están implicados en reacciones de fusión y transporte vesicular, es decir, participa en la endocitosis y la exocitosis^{113,114} (Figura 9). Las proteínas Rab, pertenecen a una gran familia de pequeñas GTPasas, regulan, coordinan y organizan el tráfico vesicular intracelular¹¹⁵⁻¹¹⁷. Estas proteínas Rab median la selección de cargo, la formación, el movimiento, la liberación de vesículas y su unión con la membrana celular (Figura 10). Estas funciones se realizan mediante la unión a los distintos efectores, uno de ellos *Rph*. Así pues, las proteínas Rab ejercen su función tanto en las rutas endocíticas, transcíticas como exocíticas (Figura 10). El podocito, una célula altamente especializada y que presenta polaridad, necesita de un correcto transporte intracelular de vesículas para su mantenimiento e integridad funcional, y en ello estarían implicadas las proteínas Rab y sus efectores^{118,119}.

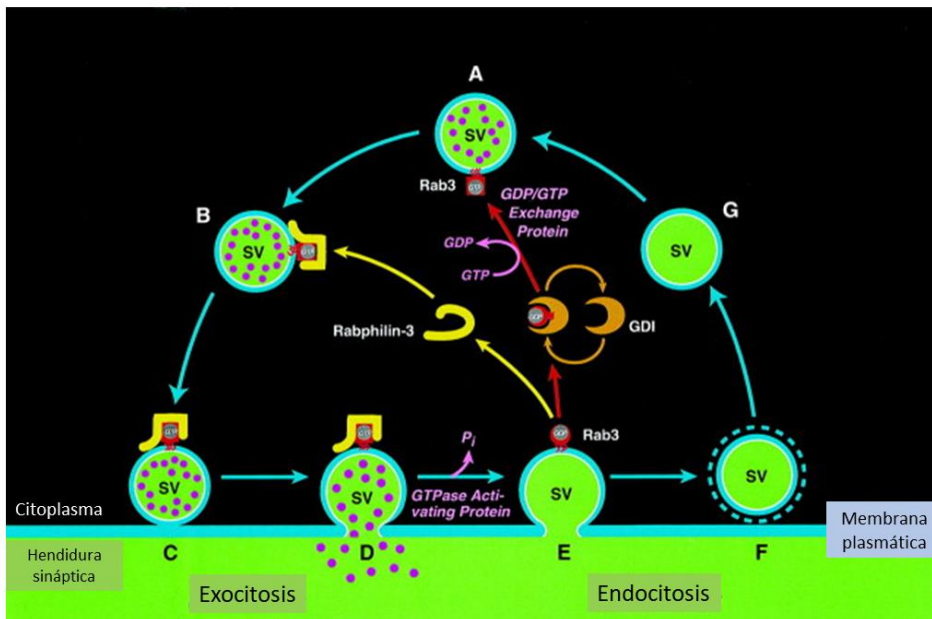


Figura 9. Infografía del papel del complejo Rab3a-Rph-3A en el sistema nervioso. Rabphilin-3A se une a la forma activa de Rab3A de las vesículas sinápticas (SV) para intervenir en la exocitosis, a la hendidura sináptica, del neurotransmisor. Figura modificada de Südhof¹¹⁴.

La parte NH₂-terminal de Rph-3A interacciona con la alfa-actinina, una proteína del citoesqueleto, y promueve la formación y organización de los filamentos de actina. Este dominio podría proporcionar un enlace entre la vesícula sináptica y el citoesqueleto que es necesario para la endocitosis^{113,120}. La parte COOH-terminal de Rph-3A contiene dos dominios C2 los cuales interaccionan con iones de calcio y con la beta-adduccin¹¹³. Curiosamente, las proteínas del citoesqueleto mencionadas anteriormente son necesarias para la integridad del podocito y su homeostasis. Además, se conoce que el patrón de expresión de *Rph-3A* se encuentra alterado en enfermedades proteinúricas de ratón y humano, lo que sugiere que Rph tiene un papel importante en la aparición y progresión de las glomerulopatías¹¹⁰. Además, un estudio posterior de este mismo grupo estableció la presencia del sistema *Rab3a-Rph-3A* sólo en glomérulos maduros o en líneas diferenciadas de podocitos de ratón sugiriendo este sistema como necesario para la maduración del glomérulo¹²¹. Una prueba más de esto se da en ratones knock-out para Rab3a en los que la vía de señalización del glutamato-Rab3a en los podocitos es relevante para la integridad de la barrera de filtración ya que una desregulación de esta vía produce cambios en los podocitos favoreciendo un aumento en la excreción de albumina en orina¹²¹. Sin embargo, el papel de la *Rph* en el sistema renal sigue siendo desconocido.

Otra prueba que demuestra la posible implicación del gen *Rph* en el sistema renal es el estudio llevado a cabo en Marracheli V et al 2014¹⁰⁹. En este estudio, mediante un análisis genómico y metabolómico se identificó que el genotipo TT del SNP rs10492025 del gen de *Rph-3A* está asociado a un incremento del riesgo de la excreción urinaria de albumina en una población general, independientemente de otros posibles factores que pueden influenciar en el riesgo de excreción urinaria de albúmina. Además, un estudio anterior ya había mostrado la asociación del mismo SNP con la presencia de albumina en orina en la cohorte de Framingham¹²².

Hay evidencias de que las proteínas Rab también están implicadas en funciones del sistema renal. Un estudio del grupo de Mundel mostró como el transporte vesicular está asociado directamente a la correcta formación de los procesos podocitarios, donde una de las proteínas asociadas es la Rab 8¹²³. Además, Cormont y colaboradores describieron como la Rab 4 interactuaba con la proteína CD2AP (molécula que forma parte de la hendidura de filtración del podocito), favoreciendo su localización hasta la membrana celular¹¹⁸. Por último, el grupo de Torban estableció como las vías que controlan la polaridad celular del podocito, controlan a su vez el reciclaje de Nephrin, una de las proteínas implicadas en esto es la Rab 5, en la que una mayor internalización de Nephrin conduciría a proteinuria¹¹⁹.

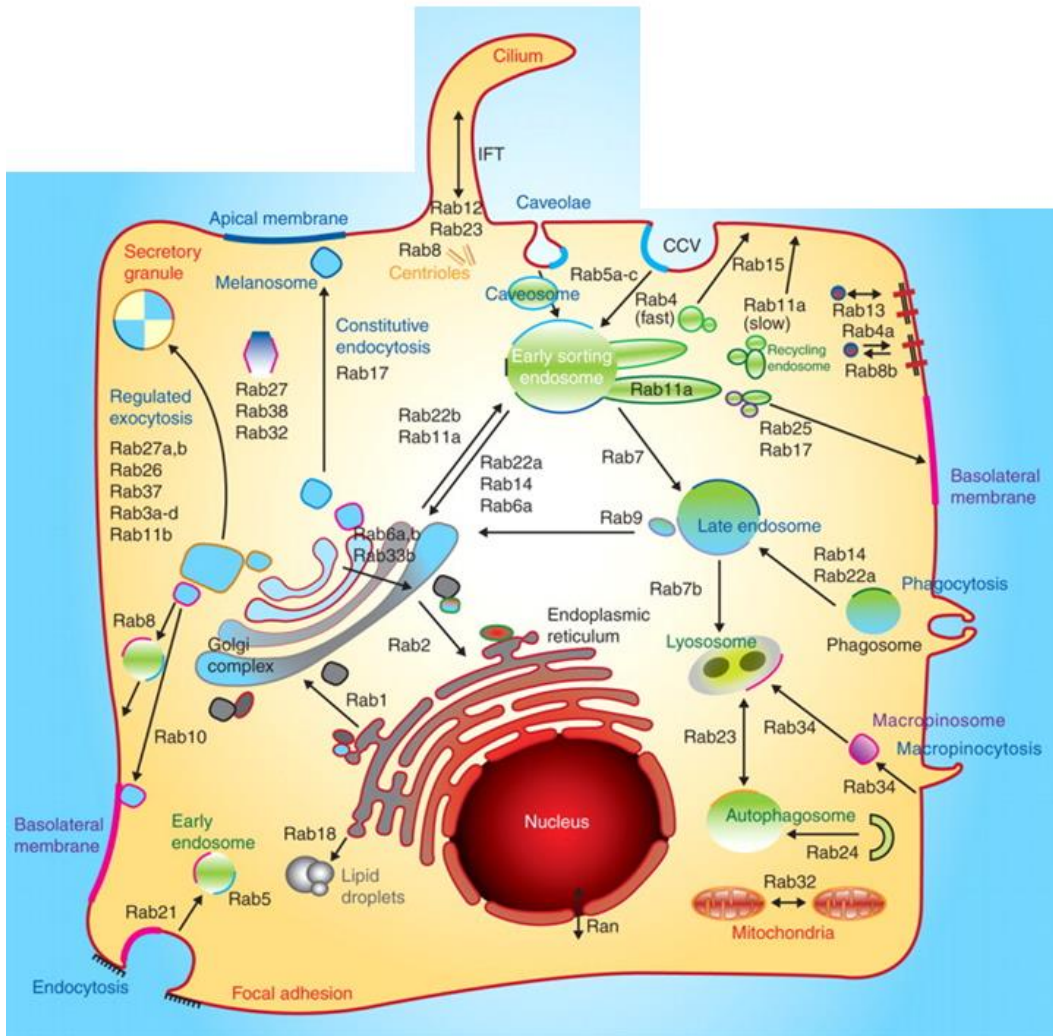


Figura 10. Ilustración de las distintas proteínas Rab GTPasas con sus funciones y su localización en una célula humana. CCV: vesícula de clatrina, GAP: GTPasa activating protien, GDF; GDI dissociation factor, GDI: GDP dissociaton inhibitor, GGT: geranylgeranyltransferase, GDP: guanosine diphosphate, GEF: guanine nucleotide exchange factor, GTP: guanosine triphosphate, IFT: intraflagellar transport, M6P: mannose 6-phosphate, M6PR: cation-independent mannose6-phosphate receptor, MPC: motor protein complex, Rab: Ras-related in brain, REP: Rab escort protein, RILP: Rab interacting lysosomal proteins, SNARE: soluble NSF attachment receptor, TIP47: tail-interacting protein 47kD. Imagen tomada y modificada de Schwartz et al. 2008¹¹⁵.

Estos resultados muestran cómo la endocitosis juega un papel muy importante en el desarrollo y mantenimiento del estado funcional del podocito, por ejemplo, regulando la internalización y reciclado de proteínas de la hendidura de filtración como nephrin y podocin¹²⁴.

La exocitosis también es una vía de transporte vesicular relevante en el podocito, y varios estudios han mostrado como están involucradas en el reciclaje de los componentes de la hendidura de

filtración¹²⁵⁻¹²⁷, por lo que alteraciones en esta vía podrían contribuir a la patogénesis de la proteinuria. Sin embargo, muchos de los mecanismos que regulan este transporte vesicular en podocitos permanecen sin aclarar.

La escasa accesibilidad a los podocitos dificulta el estudio *in vivo* de los genes que pueden estar relacionados con su lesión. Igualmente, la falta de formación de la hendidura de filtración en los podocitos en cultivo *in vitro*, hace necesario emplear modelos experimentales que puedan elucidar el papel de las proteínas Rab y sus efectores en el sistema renal. Un modelo adecuado es *Drosophila melanogaster*.

Los nefrocitos, las células homólogas a los podocitos de mamíferos, también son células con una alta actividad endocítica que requieren de un adecuado transporte vesicular intracelular para realizar correctamente sus funciones. Se ha comprobado recientemente que una gran cantidad de proteínas Rab se encuentran expresadas en los nefrocitos de *Drosophila* y que cumplen un papel esencial en los procesos de filtración y endocitosis. En concreto, Fu Y et al. 2017¹²⁸ encontró que 11 de las 27 proteínas Rab que se encuentran en *Drosophila* son necesarias para el funcionamiento de los nefrocitos, siendo las Rab 1, 5, 7, 11 y 35 las que mayor impacto tuvieron al silenciar su expresión en la célula. Encontraron que Rab 5 es clave en la regulación de la endocitosis¹²⁸, Rab 7^{60,128,129} participa en el tráfico vesicular que lleva a la degradación del cargo y Rab 11 interviene en el reciclaje de vesículas¹²⁸. Asimismo, el silenciamiento de estos genes provoca una alteración en la organización vesicular y en la integridad de estructuras celulares necesarias para el mantenimiento de la filtración y la reabsorción. Estos resultados muestran la asociación de las proteínas Rab en el mantenimiento, función e integridad de los nefrocitos de *Drosophila melanogaster*.

El papel de las proteínas Rab y Rph en el sistema renal y su función en la regulación y coordinación del tráfico vesicular, clave para la funcionalidad glomerular, proporciona una nueva vía para el entendimiento de mecanismos implicados en las enfermedades renales así como para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

6. Relación entre la enfermedad renal y la cardiovascular

El corazón y los riñones interactúan de una manera compleja y bidireccional para influir el uno sobre el otro. Esta asociación o relación entre los dos sistemas fue descrita por primera vez por Bright et al. en 1836¹³⁰. No obstante, se desconoce si un órgano es el principal causante de la disfunción en el otro órgano o si ambos están afectados en paralelo por mecanismos similares.

La insuficiencia cardiaca contribuye enormemente a la morbilidad y mortalidad de los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) y enfermedad renal en etapa terminal (ESRD); siendo una de las principales causas de emergencia y hospitalización de los pacientes, repercutiendo negativamente en la calidad de vida de éstos.

Se conoce que la disfunción renal puede aumentar el riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular de 2 a 4 veces¹³¹. Además, se ha descrito que más del 50% de las muertes de pacientes con ERC son a causa de una enfermedad cardiovascular¹³² y que aproximadamente, el 30 % de estos pacientes presentan insuficiencia cardiaca ¹³³. En pacientes con tratamiento de diálisis, la muerte por enfermedad cardiovascular representa más del 50% de los casos¹³³. Esto convierte a la enfermedad cardiovascular en la causa de muerte más común en los pacientes con enfermedades renales^{133,134}. Así pues, los individuos con ERC son más propensos a morir por una enfermedad cardiovascular que a desarrollar un fallo renal^{133,135}. Dentro de las enfermedades cardiovasculares encontramos; infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca, accidentes cerebrovasculares, enfermedad vascular periférica, hipertensión arterial, aneurismas y muerte cardiaca súbita, entre otras.

La interacción bidireccional entre el corazón y los riñones favorece que la insuficiencia cardiaca tenga un impacto en el desarrollo y progresión de la enfermedad renal, varios estudios muestran como el empeoramiento de la insuficiencia cardiaca está asociado con una pérdida de la función renal¹³⁶, estos estudios muestran que una ratio de filtrado glomerular (eGFR) baja y un elevado nivel de albuminuria están asociados con una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares. Se estima que la prevalencia de padecer ERC entre las personas con insuficiencia cardiaca es del 40%¹³⁷. Hay múltiples mecanismos diferentes que contribuyen a la aparición y desarrollo de la insuficiencia cardiaca y disfunción renal. Se conoce que las alteraciones metabólicas, nutricionales, hemodinámicas, hormonales y un estado inflamatorio que se dan en las nefropatías afectan también al sistema cardiovascular.

Los factores de riesgo de la insuficiencia cardiaca son también los factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad renal. Estos factores comunes son: la edad, la hipertensión, tabaquismo, obesidad, diabetes y dislipemia^{132,138,139}. Estudios de meta-análisis han demostrado que la disfunción renal debería ser considerada un factor de riesgo independiente para el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares⁸. Lograr revertir los factores de riesgo modificables podría ayudar a disminuir la mortalidad en pacientes con ERC. A pesar de que se conoce bien la contribución de los factores de riesgo en la aparición y desarrollo de la disfunción cardiaca y la renal, aspectos en la progresión de estas enfermedades difieren entre los pacientes con insuficiencia

cardiaca y renal. Factores o mecanismos todavía desconocidos podrían explicar estas diferencias patofisiológicas entre los pacientes. Por ello, es necesario abordar investigaciones en este sentido. Un mejor entendimiento de nuevas rutas involucradas en pacientes con fallo renal crónico y con insuficiencia cardíaca permitiría un mejor diagnóstico, prevención y tratamiento de estas enfermedades.

Los cardiomiocitos y los podocitos, células específicas del sistema cardíaco y el excretor, respectivamente, son células altamente especializadas que necesitan de mecanismos que regulan el tráfico subcelular de proteínas para mantener un correcto estado de homeostasis, crecimiento y funcionamiento. El tráfico vesicular de las células de ambos sistemas está regulado por las proteínas Rab GTPasas. Como se ha descrito anteriormente, las proteínas Rab median el transporte vesicular, tanto exocitosis como endocitosis. Se ha comprobado que la alteración en la expresión de estas proteínas Rab, como la Rab1, Rab3 y la Rab27, causa alteraciones en la estructura y la función de los cardiomiocitos^{140,141} y de los podocitos^{110,127,129}. La necesidad de un equilibrio en el tráfico vesicular por parte de las proteínas Rab en ambos tipos celulares podría explicar la afectación simultánea de estos sistemas y la relación que hay entre ambos. Esto convierte a las proteínas Rab y a sus efectores en un tema de especial interés de estudio.

Diversos estudios muestran que el modelo de *Drosophila* es adecuado para elucidar la relación entre el sistema cardíaco y el excretor ya que permite dirigir, mediante el sistema *Gal4/UAS*, la expresión de una alteración específica a uno o varios tejidos concretos, y así estudiar el efecto en otro sistema. En la mosca, uno de los órganos que se ve afectados, a parte de los nefrocitos, cuando éstos no ejercen eficientemente su función, es el corazón. Se ha observado que la alteración en la composición de la hemolinfa, debido a una disfunción del sistema excretor, causa cardiomiopatía en las moscas⁵². Varios estudios han utilizado los nefrocitos de *Drosophila* como modelo funcional para la validación de genes que se han visto implicados en la aparición y desarrollo de enfermedades renales que afectan al sistema cardíaco y viceversa^{91,94}.

7. La nefropatía diabética

Aproximadamente, el 40 % de los pacientes diabéticos desarrollan una patología renal causada por la presencia de hiperglucemia. Concretamente, el 30 % de los pacientes con diabetes mellitus de tipo 1 (DM1) y el 40 % de los pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 (DM2) presentan nefropatía diabética^{142,143}. Teniendo en cuenta que un 8-10 % de la población sufre diabetes¹⁴⁴, el número de

personas afectadas por nefropatía diabética es alarmante. Así pues, la gran cantidad de pacientes diabéticos convierte a la nefropatía diabética en la causa más frecuente de ESRD en la mayoría de los países. Además, la nefropatía diabética está asociada a un incremento en el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares como insuficiencia cardíaca¹⁴⁵.

Los dos mayores factores de riesgo para la aparición y progresión de la nefropatía diabética son la hiperglucemia y la hipertensión¹⁴⁶. Aunque hay otros factores que también influyen como son: la edad, el sexo, la raza, el perfil genético, la obesidad y hábitos como el tabaco^{147,148}. Estudios de meta-análisis han identificado mutaciones y polimorfismos en varios genes que estarían asociados con la nefropatía diabética¹⁴⁷. Estos genes son: ACE, ALR2, APOC1, APOE, EPO, eNOS, HSPG2, VEGF, FRMD3, CARS, UNC13B, CPUL/CHN2, GREM1, ELMO1, CCR5, CNDP1, ADIPOQ, PAI-1, TGF β 1 y PPAR γ . La nefropatía diabética se caracteriza por los cambios estructurales y funcionales que se dan en múltiples compartimentos y células que constituyen el riñón. La membrana basal del glomérulo y de los capilares se engrosan, se pierde el endotelio fenestrado, se expande la matriz mesangial, se observan formaciones de lesiones nodulares en el glomérulo conocidas como nódulos Kimmelstiel-Wilson¹⁴⁹, hay una reducción en el número de podocitos y una pérdida de la hendidura de filtración de éstos. Estos cambios estructurales repercuten a nivel funcional y favorecen que aparezca la hiperfiltración glomerular y aumento de la excreción de albúmina, usado como principal biomarcador para el diagnóstico de nefropatía diabética en los pacientes diabéticos, lo cual se traduce en proteinuria y en una disminución del filtrado glomerular¹⁴⁸ (Figura 11).

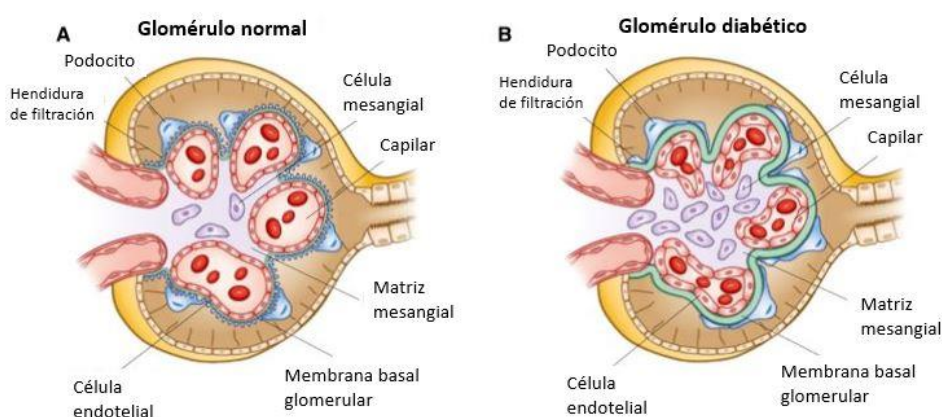


Figura 11. Esquema de un glomérulo humano normal (A) y los cambios estructurales de un glomérulo de un paciente con diabetes mellitus (B). Los cambios que se observan cuando hay presencia de hiperglucemia son: engrosamiento de la membrana basal, pérdida de la hendidura de filtración y del número de podocitos y expansión de la matriz mesangial. Imagen modificada de Alicic et al. 2017¹⁴⁸.

Los cambios estructurales entre los pacientes con DM1 y DM2 son muy similares, aunque son más heterogéneos y menos predecibles en los pacientes con DM2¹⁵⁰.

Se sabe que la hiperfiltración glomerular es una consecuencia derivada de la diabetes. Sin embargo, los mecanismos que la desencadenan se conocen poco. Un mecanismo posible de esta condición es la elevada reabsorción de glucosa en el túbulo proximal vía el cotransportador 2 de sodio-glucosa, lo cual disminuye el paso de solutos, como el NaCl, a la mácula densa. Esto puede dar como resultado la dilatación de la arteriola aferente y así aumentar la perfusión glomerular. Además, los niveles de angiotensina II aumentan en la arteriola eferente lo que conduce a una vasoconstricción y producción de moléculas proinflamatorias y profibróticas. Por tanto, en conjunto se produce un aumento de la presión intraglomerular^{147,148}.

Para elucidar los mecanismos que subyacen a la nefropatía diabética y explorar nuevos tratamientos que puedan parar o revertir la progresión de ésta se han utilizado distintos animales modelo. La gran mayoría de los estudios se realizan con modelos murinos.

El subcomité de nefropatía de *Animal Models of Diabetic Complications Consortium* (AMDCC) publicó los criterios para que un modelo animal sea considerado como modelo adecuado para el estudio de la nefropatía diabética. Estas características son: tener más del 50 % de pérdida de la función renal, tener niveles 10 veces superiores de albuminuria que controles y poseer las características histológicas de la patología como expansión de la matriz mesangial, engrosamiento de la membrana basal glomerular, hialinosis arterial y fibrosis tubulointersticial¹⁵¹. En la actualidad, no existe ningún modelo que cumpla todas las características descritas anteriormente. No obstante, hay modelos animales que desarrollan parte de las características y que ayudan a entender algunos aspectos de la enfermedad.

Existen modelos para el estudio de la nefropatía diabética derivada tanto de la DM1 como de la DM2. Los animales modelo murinos con DM1 se pueden obtener mediante la inducción de hiperglucemia, con la administración de toxinas como streptozotocina (STZ), que es tóxico para las células β del páncreas y crea una deficiencia absoluta de insulina, o bien por mutaciones o deleciones de genes específicos implicados en la enfermedad^{152,153}.

En cuanto a los modelos genéticos para el estudio de la DM1, encontramos al ratón mutante Akita, el cual presenta una mutación en el gen *Ins2* que se traduce en una insulina aberrante que resulta tóxica para las células β del páncreas. Otro ratón modelo es *OVE26FVB* que sobre-expresa calmodulina en las células β del páncreas, lo que resulta en una deficiencia en producción de insulina y aparición de DM1^{152–154}.

Para el estudio de la nefropatía diabética causada por la DM2 se usan líneas modificadas genéticamente; éstos presentan modificaciones en la función de leptina, como los ratones *ob/ob*, *db/db* o las ratas *Zucker*. Otro modelo que muestra características de nefropatía diabética es la línea de ratón que presenta deficiencia funcional para *eNOS*^{155–157}. Un modelo alternativo para el estudio de este tipo de nefropatía diabética se consigue alimentando ratones con una dieta alta en grasas. Estos ratones los niveles altos de lípidos sistémicos (lipotoxicidad) pueden desencadenar cambios a nivel renal que pueden ser confundidos con los cambios provocados por la hiperglucemia¹⁵⁸.

Las ratas también se han usado para modelizar la enfermedad ya que presentan algunas ventajas con respecto a los ratones. Su mayor tamaño permite la fácil monitorización de la fisiología renal y accesibilidad a mayor cantidad de tejido para el análisis. Además, las ratas son más susceptibles a padecer problemas cardiovasculares incluyendo la hipertensión. Sin embargo, las ratas tratadas con STZ presentan cambios renales menos severos que los ratones tratados con STZ, es por esto que se utilizan con menos frecuencia¹⁵³.

A pesar de que hay un gran número de roedores que sirven como modelo para el estudio de la nefropatía debida a la diabetes, tanto de tipo 1 como de tipo 2; ninguno de estos modelos logra presentar todas las características histopatológicas de la nefropatía diabética que se dan en humanos^{9,151}. Esto podría explicar por qué terapias que funcionan en los modelos son menos efectivas en pacientes con nefropatía diabética.

Otros animales modelo que se han usado son el perro y el cerdo. Los perros, con la administración de *alloxan* desarrollan lesiones glomerulares¹⁵⁹. Los cerdos que también presentan lesiones glomerulares se han empleado para la búsqueda de agentes terapéuticos¹⁶⁰. A pesar de mostrar características similares de pacientes con nefropatía diabética, estos animales no muestran características de la enfermedad en etapa avanzada como fibrosis tubulointersticial y pérdida de la función renal.

Los organismos invertebrados como *Drosophila melanogaster* y *Zebrafish* también se han utilizado por sus múltiples ventajas descritas anteriormente. En *Zebrafish* se puede conseguir el modelo diabético por la administración de STZ^{161,162}. En *Drosophila* se consigue un modelo de nefropatía diabética (con DM tipo 2) mediante la administración de una dieta rica en azúcar, éste desarrolla características propias de la enfermedad que incluyen hiperglucemia, hiperlipidemia, resistencia a la insulina y cardiomiopatía. En este modelo se observa una disfunción de los nefrocitos, célula análoga al podocito de mamíferos, y cambios en la expresión de genes específicos del tejido, como *Sns* (ortólogo de *Nephrin*), al igual que en humanos con nefropatía diabética¹⁰⁰. Esta disminución de

la expresión de *Sns* por los altos niveles de azúcar en el organismo, se debe a la regulación transcripcional mediante una ruta que incluye a *Knot*, el ortólogo de EBF2. Además, la morfología y la función de los nefrocitos de estas moscas se vio afectada. *Drosophila* también puede ser modelo de DM tipo 1 para el estudio de la nefropatía diabética en este caso. La mosca presenta un total de 8 péptidos de tipo insulina (*insulin-like peptides*) y un receptor para éstos denominado DInR o InR. Este receptor funciona de forma similar al receptor de mamíferos respondiendo sólo a la insulina frente a otras hormonas. Asimismo, distintos estudios mostraron la similitud entre las rutas de señalización de insulina entre las moscas y los humanos¹⁶³. A pesar de que se ha demostrado que *Drosophila* puede ser modelo de diabetes tipo 1 por la eliminación de estas células productoras de insulina y que desarrollan características típicas de la enfermedad^{164,165} ningún grupo ha abordado hasta el momento el estudio de la nefropatía diabética en este modelo.

Pese a que estos animales modelo han sido de gran utilidad para esclarecer mecanismos y rutas importantes para el inicio y la progresión de la enfermedad, las diferencias estructurales y funcionales en comparación con los humanos hace imprescindible la validación de los resultados en mamíferos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Actualmente, la implicación del complejo *Rab-Rabphilin* en la aparición de la enfermedad renal parece clara^{109,110,121,166}. Aunque las funciones de las proteínas que forman este complejo han sido bien estudiadas en el sistema nervioso^{111–115,167}, se desconoce la función de los componentes que forman este complejo y su implicación en la aparición y desarrollo de la enfermedad renal. Pese a que los modelos murinos y celulares son adecuados para el estudio de las glomerulopatías, la dificultad de estudiar mecanismos de la patología renal *in vivo* en éstos hace necesario la utilización de *Drosophila melanogaster*. *Drosophila*, además de presentar una serie de ventajas como alta progenie, tiempos de generación cortos, bajo costes de mantenimiento, gran cantidad de genes con homología a genes humanos y técnicas para su manejo; también presenta un sistema excretor cuyas células principales, los nefrocitos, comparten una gran similitud estructural, funcional y molecular con los podocitos de mamíferos.

Además, aunque se conoce la interacción bidireccional entre el sistema renal y el cardiovascular y la influencia de la enfermedad renal en la aparición y progresión de las enfermedades cardiovasculares, muchos de los mecanismos quedan todavía por esclarecer. *Drosophila*, ofrece un modelo perfecto para el estudio en este sentido ya que posibilita la expresión dirigida de una enfermedad a un tejido concreto.

Por ello, en la presente tesis se ha planteado como objetivo principal caracterizar la función del complejo *Rab-Rabphilin* en el sistema excretor, la influencia de su alteración en el sistema cardiaco de *Drosophila* y la búsqueda de compuestos que puedan parar o revertir la enfermedad renal.

Para cumplir con el objetivo general de este trabajo se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1. Caracterización del papel de *Rabphilin* en los nefrocitos pericárdicos de *Drosophila melanogaster*.**
- 2. Implicación de *Rabphilin* en el sistema cardiaco de *Drosophila melanogaster*: relación con el sistema excretor de la mosca.**
- 3. Estudio de la función de las proteínas Rab 3 y Rab 27 en el sistema excretor de *Drosophila melanogaster*.**

- 4. Cribado farmacológico para la búsqueda de compuestos con acción positiva contra el daño renal en un modelo de *Drosophila*.**

CAPÍTULO 1

***Rabphilin* es necesaria para la filtración, endocitosis y mantenimiento de los nefrocitos pericárdicos de *Drosophila melanogaster*.**

Los resultados de este capítulo están incluidos en:

Selma-Soriano E., Llamusi B, Fernández-Costa JM., Ozimski LL, Artero R, y Redón J. “*Rabphilin is involved in filtration and protein uptake in Drosophila nephrocytes.*” Enviado a DMM.

CAPÍTULO 1

***Rabphilin* es necesaria para la filtración, endocitosis y mantenimiento de los nefrocitos pericárdicos de *Drosophila melanogaster*.**

Los resultados de este capítulo están incluidos en:

Selma-Soriano E., Llamusi B, Fernández-Costa JM., Ozimski LL, Artero R, y Redón J. “*Rabphilin is involved in filtration and protein uptake in Drosophila nephrocytes.*” Enviado a DMM.

1.1 Introducción

El gen *Rabphilin 3A* (*RPH-3A*) codifica para una proteína efectora de las proteínas Rab GTPasas implicadas en las reacciones de coordinación y fusión de vesículas y la regulación de los procesos exo- y endocitosis en el sistema nervioso central¹¹³. *RPH-3A* forma un complejo proteico con Rab3A, una proteína perteneciente a la familia de las pequeñas proteínas GTPasas, que se localiza alrededor de la hendidura de filtración de podocitos de mamíferos¹¹⁰. En el estudio llevado a cabo en Rastaldi MP et al.¹¹⁰ se demostró que la expresión de *RPH-3A* está alterada en enfermedades proteinúricas de mamíferos, este descubrimiento sugiere que el complejo *RPH-3A*-Rab3a podría tener un papel clave en glomerulopatías. Otros datos que apoyan el papel del gen *RPH-3A* en las enfermedades proteinúricas humanas son los análisis genómicos y metabolómicos, el estudio llevado a cabo por Marrachelli V et al.¹⁰⁹ mostró que poseer el genotipo TT del SNP rs10492025 del gen de *RPH-3A* está asociado a un incremento del riesgo de la excreción urinaria de albumina en la población general. No obstante, se desconoce el impacto estructural y funcional de las alteraciones de la expresión de *RPH-3A* en los podocitos. Por este motivo, es importante abordar el estudio del papel de *RPH-3A* en la integridad de los podocitos y en el mantenimiento de la función glomerular normal. En este sentido, *Drosophila* proporciona un modelo experimental adecuado, ya que los nefrocitos y los podocitos presentan una gran homología tanto estructural, funcional como molecular^{38–40,54,67,168,169}. Esto hace que los nefrocitos de *Drosophila* sean interesantes para estudios *in vivo* de enfermedades renales que pueden ser difíciles de realizar en mamíferos debido a la falta de accesibilidad de las células. Como se ha explicado en la introducción, los nefrocitos forman el sistema excretor de *Drosophila*^{40,168}. Son células involucradas en la eliminación de productos de desecho de la hemolinfa. Existen dos poblaciones distintas de nefrocitos: los nefrocitos de *Garland* situados alrededor del esófago (binucleados) y los nefrocitos pericárdicos (mononucleados) situados a lo largo del corazón. Al igual que en los podocitos de mamíferos, la membrana basal del nefrocito forma una barrera de filtración selectiva de carga³⁹. La segunda barrera de filtración es el diafragma de nefrocito (ND) o

hendidura de filtración, formado por *Kirre* and *Stick and Stones* (*Sns*), que son los ortólogos de *Drosophila* de las proteínas *Neph-1* y *Nephrin* de la hendidura de filtración, *slit diaphragm* (SD) de mamíferos, respectivamente. La membrana nefrocítica forma invaginaciones llamadas canales laberínticos, donde ocurre la mayor parte de la captación endocítica^{54–56,63,69,168}. *Kirre* y *Sns* sellan estas invaginaciones para formar poros de 40 nm de diámetro, que son la entrada a los canales laberínticos⁵⁴. *Cubilin* y *Amnionless* se encuentran en la parte más interna de estos canales, donde estas proteínas que forman un complejo tienen un papel importante en la endocitosis^{55,63}. Un requisito para la diferenciación y el mantenimiento de los nefrocitos es la expresión del factor de transcripción *Krüppel-like factor 15* (*Klf15*)^{49–51}. En los mutantes de *Klf15*, tanto los nefrocitos de *Garland* como los nefrocitos pericárdicos están ausentes, pero las moscas mutantes de *Klf15* exhiben una esperanza de vida normal⁴⁹.

En este estudio mostramos la expresión de *Rph*, el ortólogo de *Drosophila* de *Rph-3A*, en los nefrocitos pericárdicos y la colocalización con marcadores moleculares de vías tanto endocíticas como exocíticas. La interferencia de la expresión de *Rph* en los nefrocitos produjo un bloqueo en la filtración y la endocitosis de moléculas de dextrano de diferentes tamaños, alteró la eliminación de toxinas (AgNO_3) y redujo la expresión de genes esenciales para el nefrocito, como *Cubilin* y *Sns*. Es importante destacar que el silenciamiento de *Rph* afectó a la ultraestructura del nefrocito, el tamaño de los canales laberínticos se redujo, disminuyó el número de endosomas y finalmente dio como resultado la pérdida del nefrocito de *Drosophila*. Nuestros resultados indican que *Rph* es necesario para la filtración y para la ruta endocítica. En resumen, la pérdida de función de *Rph* tiene un fuerte impacto en la estructura, función y diferenciación de los nefrocitos.

1.2 Material y métodos

1.2.1 Líneas de *Drosophila*

Las líneas *Hand-Gal4*, *UAS-IR-Rph* (número BDSC: 25950), *UAS-IR-bcd*, *UAS-GFP* y *yw* se obtuvieron de *Bloomington Drosophila Stock Center* (Universidad de Indiana). La línea *Sns-Gal4 UAS-GFP* se obtuvo del laboratorio de la Dra. M Ruiz-Gómez (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC y UAM). Otras líneas *UAS-IR-Rph*, KK107492 y v52438 se obtuvieron de *VDRC Stock Center*. La línea recombinante *Hand-Gal4 UAS-GFP* se generó en este trabajo para marcar los nefrocitos pericárdicos adultos. Todos los cruces se mantuvieron a 25 °C en medio nutritivo estándar.

1.2.2 Análisis de la supervivencia de *Drosophila*.

Se recolectaron más de 50 machos recién nacidos por genotipo, se colocaron en tubos que contenían medio nutritivo estándar, medio suplementado con diferentes concentraciones de AgNO_3 (0.005% o 0.01% AgNO_3) o suplementado con ácido retinoico (1 μM , 10 μM y 50 μM) y se mantuvieron a 25 o 29°C. El número de muertes se anotó diariamente y las moscas se transfirieron a un medio fresco cada 2 o 3 días. Las curvas de supervivencia se obtuvieron utilizando el método de *Kaplan-Meier*, y las comparaciones de curvas estadísticas se realizaron de acuerdo con la prueba de *log-rank (Mantel-Cox)* ($\alpha = 0.05$).

1.2.3 Ensayo de toxicidad

Se transfirieron 20 larvas de primer estadio (L1) de cada genotipo a viales suplementados con diferentes concentraciones de AgNO_3 o ácido retinoico y se mantuvieron a 25°C. El número de larvas que alcanzaron el estadio de pupa se anotó para determinar la toxicidad. Los resultados se analizaron mediante la prueba *t* de *Student* no pareada de dos colas ($\alpha = 0.05$), aplicando la corrección de *Welch* cuando era necesario. El experimento se realizó por triplicado.

1.2.4 Inmunofluorescencia

Se diseccionaron corazones adultos junto con nefrocitos pericárdicos de hembras de 7 días de edad en hemolinfa artificial de *Drosophila* según el protocolo descrito en Selma-Soriano et al¹⁷⁰, se fijó con paraformaldehído al 4% (PFA) en tampón salino fosfato (PBS) durante 20 min y se permeabilizó lavando 3 veces con PBS que contenía 0.3% de Tritón-X (PBS-T) durante 10 min. Luego, los corazones se bloquearon en PBS-T que contenía BSA al 0.5% durante 30 min a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (1: 100) toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-Rph (Abcam, ab3338; con 50% de similitud), anti-Hrs (DSHB), anti-Rab 3 y anti-Rab 27 (BD Bioscience), y anti-Klf15 (Abcam, ab22851; con 59% de similitud). Después de 3 lavados con PBS-T, los anticuerpos secundarios (1: 200), *anti-rabbit* AlexaFluor-647 (Life technologies, A31573), *anti-mouse* biotinilado (Sigma-Aldrich, B7264) y *anti-rabbit* biotinilado (Sigma- Aldrich, B8895) se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Los corazones junto con los nefrocitos pericárdicos se incubaron con solución ABC (kit ABC, VECTASTAIN) durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de lavados e incubación con estreptavidina-TexasRed (Vector, 1: 500). Todas las imágenes se tomaron con un microscopio confocal LSM 800 (Zeiss) y se procesaron con el software ZEN.

1.2.5 Cuantificación del volumen y el número de nefrocitos

Para el análisis del número y volumen de los nefrocitos, se diseccionaron corazones de mosca hembra adulta en PBS 1X. Las imágenes confocales se obtuvieron con el microscopio confocal FLUOVIEW FV1000 (Olympus) utilizando un objetivo de aire de 10 x o 20 x. Las estructuras 3D se reconstruyeron a partir de imágenes confocales utilizando el software IMARIS 7.1 (Bitplane). Para la cuantificación, los ajustes de las imágenes confocales fueron invariantes dentro de cada experimento. Para la cuantificación del volumen, se analizaron al menos 4 nefrocitos de 3 moscas diferentes. Los resultados se analizaron mediante la prueba *t* de *Student* no pareada de dos colas ($\alpha = 0.05$), aplicando la corrección de *Welch* cuando era necesario.

1.2.6 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los corazones con los nefrocitos pericárdicos diseccionados de hembras de 7 días se procesaron como se describió previamente en Selma-Soriano et al.¹⁷¹. Los abdominales se fijaron en PFA al 1% y glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0.2 M durante 30 min y se fijaron posteriormente con tetróxido de osmio al 1% durante 2 h. Después del deshidratado, los abdómenes con los nefrocitos se embebieron en resina epoxi. Se obtuvieron secciones semi-finas (1.5 μm) y ultrafinas utilizando un ultramicrotomo (Ultracut E, Reichert-Jung y Leica). Las muestras se analizaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 a un voltaje de operación de 80 kV.

1.2.7 Análisis de las estructuras celulares del nefrocitos de imágenes tomadas con microscopio electrónico de transmisión (TEM)

La cuantificación de las imágenes de TEM se realizó contando el número de hendiduras de filtración en la membrana plasmática de nefrocitos pericárdicos con un aumento de X8000. El tamaño de los poros se midió a tres niveles diferentes (en la parte más interna, media y superior del poro) con un aumento de X30,000. El número de endosomas y lisosomas se obtuvo a partir de imágenes con magnitud de X800 que contenían una sección completa de las células. Se identificaron los endosomas como las vesículas blancas situadas cerca de la membrana, y los lisosomas como las vesículas oscuras ubicadas en el centro del nefrocito. Se analizaron imágenes de al menos seis nefrocitos controles y cuatro nefrocitos del *IR-Rph* debido a la pérdida de estas células en estos últimos. Los resultados se analizaron mediante la prueba *t* de *Student* no pareada de dos colas ($\alpha = 0.05$).

1.2.8 Análisis *in vivo* de la filtración y la captación de moléculas de dextrano

Los corazones de moscas hembra adultas se diseccionaron en hemolinfa artificial de *Drosophila* y se incubaron con 0.1 mg / ml de dextrano 10-kD (AlexaFluor568, Invitrogen) o con 0.1 mg / ml de dextrano 70-kD (ThermoFisher, D1830). Después de 15 minutos de incubación, los corazones junto con los nefrocitos se lavaron 3 veces con PBS. Inmediatamente, las muestras se montaron para obtener imágenes confocales. Los resultados se analizaron mediante la prueba *t* de *Student* no pareada de dos colas ($\alpha = 0.05$).

1.2.9 Análisis cuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-qPCR)

Para la transcripción inversa seguida de la cuantificación de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR), el RNA, proveniente de la disección de 100 corazones con los nefrocitos, se aisló usando el reactivo *Trizol* (Invitrogen). La pureza y la concentración de RNA se determinó con *Nanodrop-1000* (Thermo Scientific). El RNA total (1 μ g) se transcribió de forma inversa con la polimerasa *Superscript II* (Invitrogen). La qPCR, usando *SYBR-Green*, se realizó en el sistema de PCR *QuantStudio 5* (Applied Biosystems). *Rp49* y *Tub48B* se utilizaron como genes endógenos. En todos los casos, la expresión relativa de los genes endógenos y del grupo control se obtuvo mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Las muestras se analizaron mediante la prueba *t* de *Student* no pareada de dos colas ($\alpha = 0.05$), aplicando la corrección de *Welch* siempre que fue necesario.

1.3 Resultados

1.3.1 *Rabphilin* se expresa en los nefrocitos pericárdicos de *Drosophila*.

Con el fin de utilizar *Drosophila* como modelo para estudiar el papel de *Rph* en los nefrocitos, primero investigamos la expresión y localización de esta proteína en moscas adultas de 7 días de edad. Para marcar los nefrocitos utilizamos el sistema binario *Gal4-UAS* para expresar el marcador GFP bajo el control de *Hand-Gal4*, que promueve la expresión en los cardiomioblastos embrionarios y las células pericárdicas (nefrocitos).

Las preparaciones de corazón y nefrocitos de moscas *Hand-Gal4 UAS-GFP* permitieron la visualización directa de nefrocitos pericárdicos bajo el microscopio confocal. Para detectar *Rph*, aprovechamos la alta conservación evolutiva de esta proteína y realizamos una tinción de inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal comercial anti-*Rph* 3A humano.

En las moscas control (*Hand-Gal4 UAS-GFP*), la inmunofluorescencia mostró una señal con un patrón punteado en los nefrocitos pericárdicos (Figura 1.1 A-A'''). Demostramos la especificidad del anticuerpo ya que la señal disminuyó cuando se realizó la misma inmunofluorescencia en moscas que presentaban interferencia de la expresión, RNAi, de *Rph* (*Hand-Gal4> UAS-GFP UAS-IR-Rph*, llamado en adelante *IR-Rph*) (Figura 1.1 B-B'''). Para validar la especificidad del fenotipo inducido por la RNAi, estudiamos los efectos de la interferencia de la expresión de *Rph* utilizando diferentes líneas. Observamos que las distintas líneas de RNAi exhibían diferentes niveles en la señal de *Rph*. En las tres líneas analizadas, la señal de *Rph* se redujo, pero el efecto más fuerte se detectó con la línea 25950 procedente del *Bloomington Drosophila Stock Center*, BDSC (Figura 1.1 y Figura Anexo 1.1).

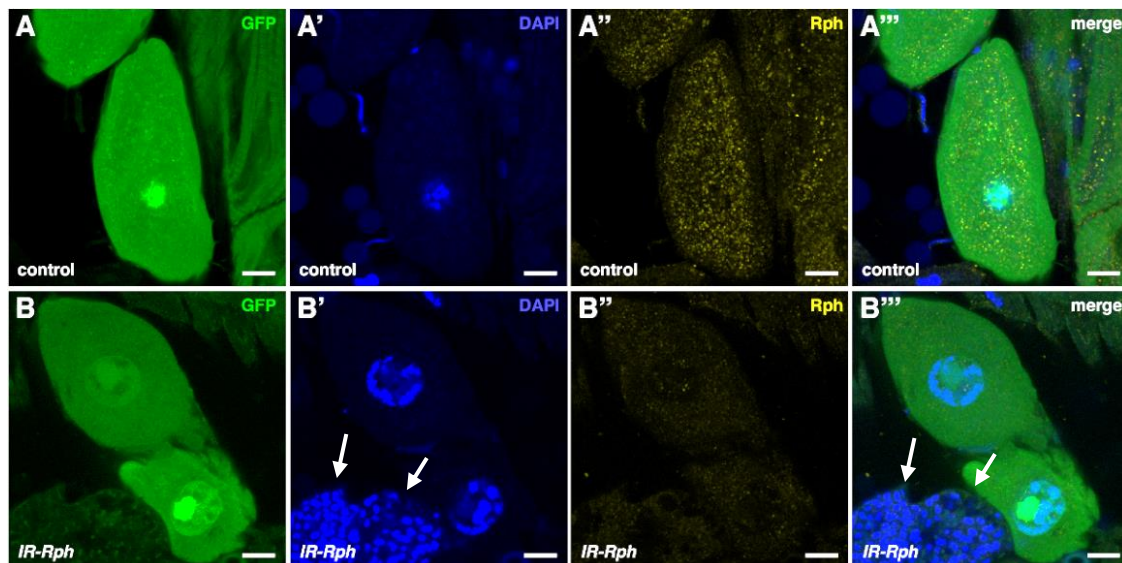


Figura 1.1. *Rph* se expresa en nefrocitos pericárdicos de *Drosophila*. Imágenes confocales de moscas adultas que expresan el reportero GFP (verde en A y B) bajo el control de *Hand-Gal4*. La inmunotinción con anticuerpo anti-*Rph* (A'', A''', B'' y B''') reveló la presencia de *Rph* en los nefrocitos de las moscas control (A-A'''), pero no en las moscas que expresan un RNAi contra *Rph* (B-B'''). En los paneles B' y B''' se observa un nefrocito no funcional en la parte inferior izquierda (membrana y núcleo fragmentados; flecha). Los núcleos se contrastaron con DAPI (azul). Escala = 10 μ m.

1.3.2 *Rph* mantiene el estado de diferenciación de los nefrocitos.

Para evaluar el papel de *Rph* en los nefrocitos de *Drosophila*, contamos el número de nefrocitos pericárdicos funcionales, que se caracterizan por tener una fuerte expresión de GFP y núcleos intactos (sin fragmentación); y medimos el volumen celular en moscas control y moscas *IR-Rph*.

Estos dos parámetros, como se ha demostrado previamente, informan sobre la viabilidad y la funcionalidad, respectivamente^{49,86}. El número promedio de nefrocitos cuantificados en moscas *IR-Rph* adultas de 1 semana se redujo significativamente en comparación con las moscas control (Figura 1.2 B y Figura Anexo 1.1 D). Además, el índice de dispersión del volumen calculado como volumen SD / mediana, estaba incrementado de manera significativa en las moscas *IR-Rph* (Figura 1.2 A), lo que refleja una variabilidad anormal en el volumen promedio de estos nefrocitos (Figura 1.2 C y D). Para evaluar si la pérdida de nefrocitos en las moscas *IR-Rph* podría deberse a un proceso de desdiferenciación, se estudió la expresión del ortólogo de *Drosophila KLF15 (dKlf15)*, que es fundamental para el desarrollo y la diferenciación tanto de los nefrocitos de *Drosophila* como de los podocitos. Éste también se puede utilizar como marcador de diferenciación terminal⁴⁹⁻⁵¹.

La inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo policlonal contra un péptido sintético de KLF15 humano (aminoácidos 45-94), mostró una fuerte expresión de dKlf15 en los nefrocitos control (Figura 1.2 E-E''), mientras que la señal estaba ausente en la mayoría de las moscas *IR-Rph* de 1 semana de edad (Figura 1.2 F-F''). En contraste, la expresión de dKlf15 fue normal en los nefrocitos *IR-Rph* de moscas de 1 día (Figura 1.2 G-G'' y H-H''), lo que sugiere que la expresión de este factor de transcripción se pierde con el tiempo. Estos resultados muestran que la disminución de los niveles de Rph en los nefrocitos promueve su desdiferenciación, que en última instancia provocaría su pérdida. Por lo tanto, Rph podría ser necesario para el mantenimiento del estado de diferenciación de los nefrocitos.

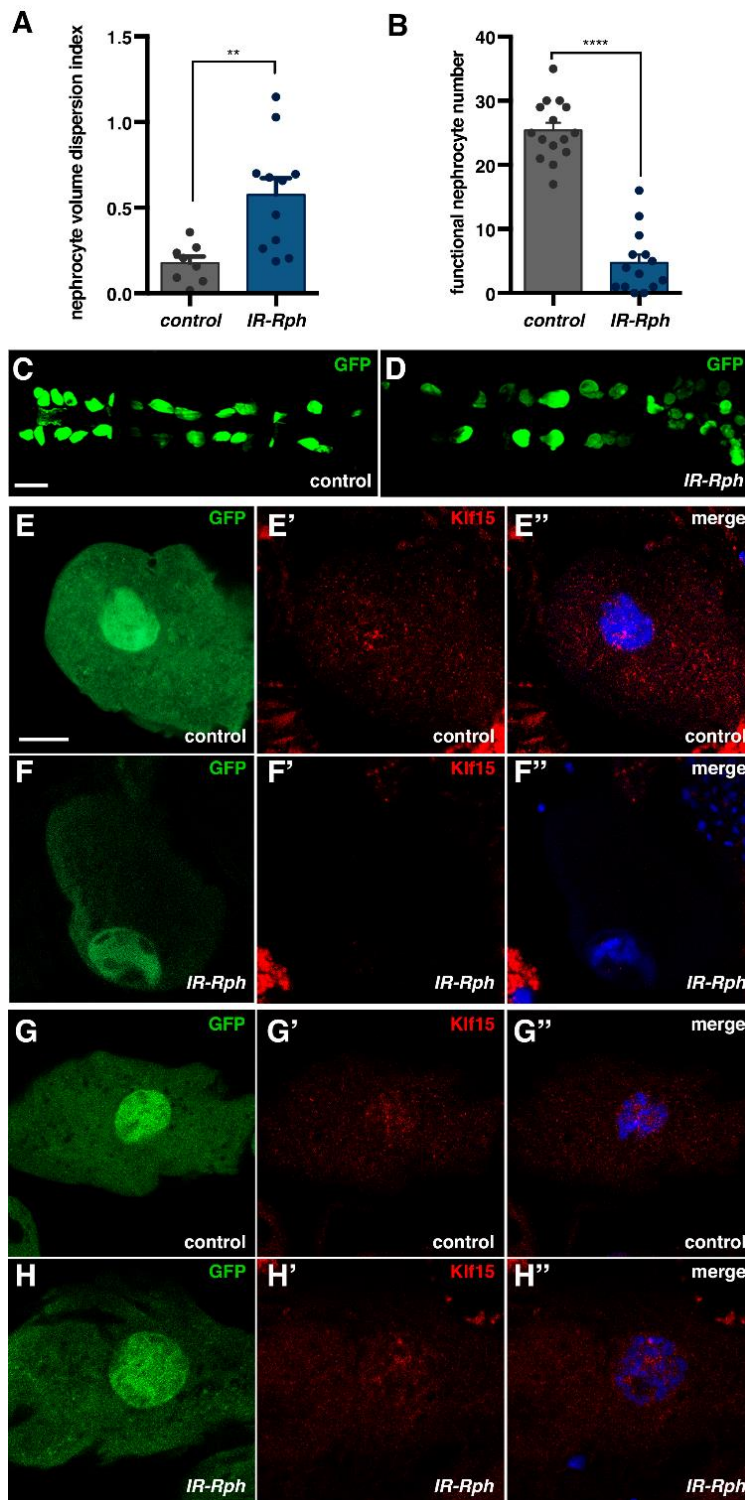


Figura 1.2. Los nefrocitos pericárdicos adultos requieren la expresión de *Rph* para el mantenimiento de su estado de diferenciación. Cuantificación del índice de dispersión del volumen de nefrocitos (A) y número promedio de nefrocitos (B). Imagen de microscopía de fluorescencia de nefrocitos pericárdicos control (C) y nefrocitos *IR-Rph* (D). Imágenes confocales de nefrocitos de moscas adultas control de 1 semana y 1 día de edad (E-E'' y G-G'', respectivamente) y nefrocitos de moscas adultas *IR-Rph* de 1 semana y 1 día (F-F'' y H-H'', respectivamente), marcadas con GFP (verde) e inmunotinción con un anticuerpo anti-Klf15 (rojo en E', F', G' y H'). Test estadístico: t de Student. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. Escala = 100 μm y 10 μm .

1.3.3 La expresión reducida de *Rph* altera el tráfico vesicular en nefrocitos

Es bien sabido que *Rph* participa en el tráfico vesicular en otros tipos celulares, como las neuronas¹¹². Se ha demostrado que *Rph* puede interactuar con Rab 3a y Rab 27a *in vitro* y puede

formar complejos con estas Rabs en células PC12 de la médula suprarrenal de rata¹¹². Además, estudios previos en modelos de mamíferos mostraron que Rph-3A formaba un complejo con Rab3A en el riñón, donde se localizan específicamente en podocitos¹¹⁰.

Dado que se conoce que varias funciones de Rph3A están reguladas por estas proteínas Rab, en sistemas neuronales y endocrinos, realizamos una doble inmunofluorescencia con anticuerpos contra Rph y Rab 3 o Rab 27 en nefrocitos pericárdicos (Figura 1.3). El análisis de imágenes de las señales reveló que el 58.8% de la señal de Rph se colocaliza con Rab 3, mientras que el 80.0% de la señal de Rab 3 coincidió con Rph (Figura 1.3 A-A''' y D). En el caso de la colocalización con Rab 27, observamos que casi toda la señal de Rph se colocalizó con la proteína Rab 27 (más del 96% del porcentaje de colocalización), mientras que solo el 13.9% de la señal de Rab 27 colocalizó con la señal de Rph (Figura 1.3 B-B''' y E). Este dato apoya que el ortólogo de *Drosophila* en nefrocitos conserve el papel de la Rph de mamíferos en el transporte vesicular. Para ver si Rph tiene un papel en la vía endocítica, realizamos un ensayo de doble inmunofluorescencia contra Rph y el sustrato de tirosina quinasa regulado por el factor de crecimiento de hepatocitos, Hrs, (Figura 1.3 C-C''') en los nefrocitos pericárdicos. Hrs es una proteína esencial que está implicada en la señalización celular y el tráfico de membrana intracelular¹⁷². Muy recientemente, varios informes han demostrado un papel para Hrs en la ruta endocítica de proteínas de membrana ubiquitinadas¹⁷³.

De acuerdo con los coeficientes de colocalización, el 100% de la señal Rph colocalizó con Hrs y el 98.9% de la señal de Hrs colocalizó con Rph (Figura 1.3 C-C''' y F). Este resultado indica el posible papel de Rph en la vía endocítica y el tráfico vesicular en nefrocitos.

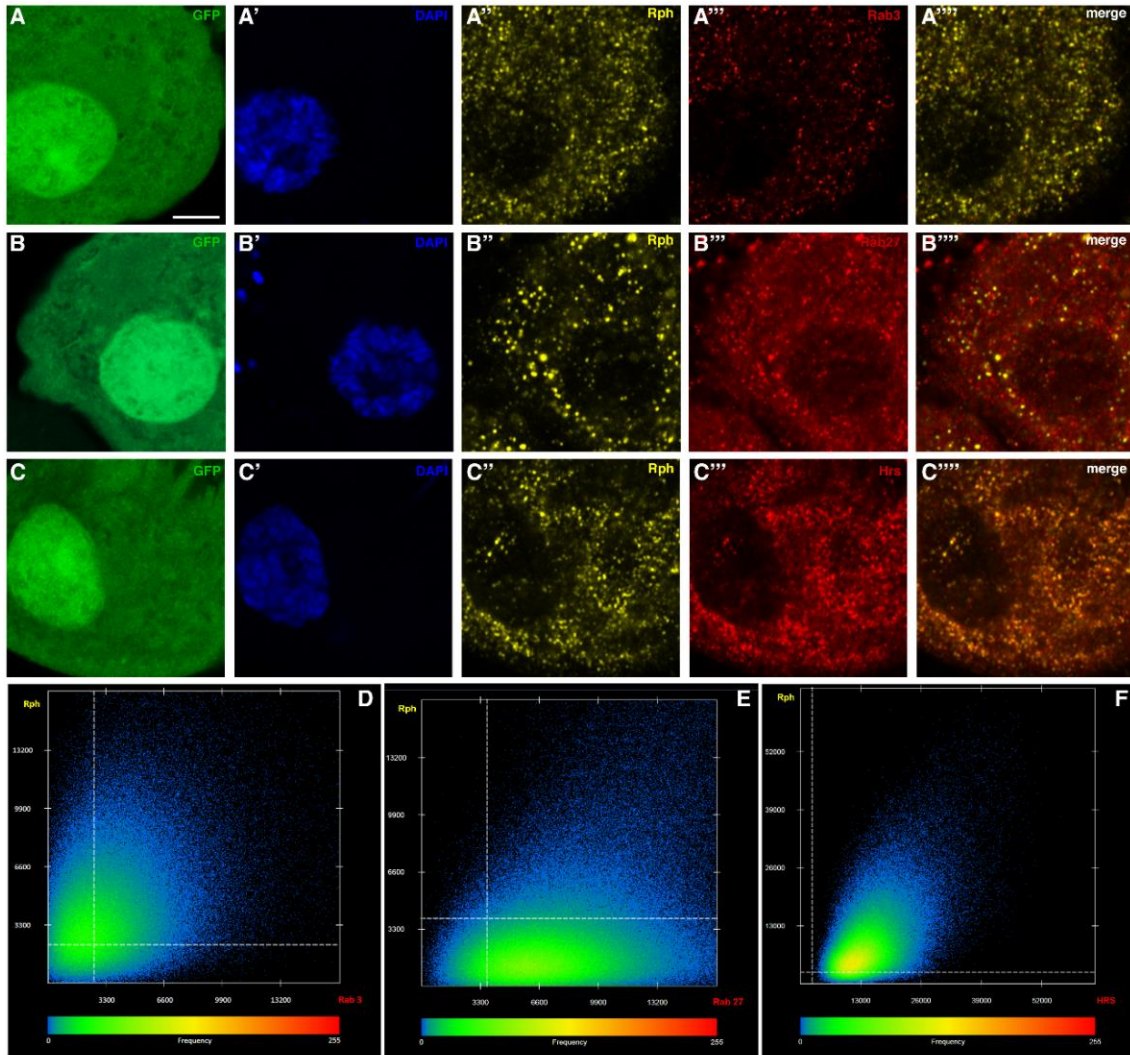


Figura 1.3. Papel de Rph en la ruta endocítica y transporte vesicular. Doble inmunofluorescencia con anticuerpos contra Rph (A'', B'' y C'') y Rab 3 (A'''), Rab 27 (B''') o Hrs (C'') en nefrocitos controles, marcados con GFP (verde) y DAPI (azul). Gráficos de dispersión que muestran las intensidades de las señales de Rph trazadas en el eje y frente a las intensidades de Rab 3 (D), Rab 27 (E) y Hrs (F) en el eje x. El umbral en ambos ejes está marcado por líneas blancas discontinuas. Escala = 5 μ m.

Para demostrar la relevancia funcional de la falta de Rph en el tráfico intracelular, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia contra Rab 3, Rab 27 y Hrs en los nefrocitos *IR-Rph*. Observamos que la señal de Rab 3 disminuyó en comparación con los nefrocitos control (Figura 1.4), mientras que no hubo cambios en las señales de Rab 27 y Hrs. Este resultado sugiere una alteración en este tipo de vesículas endocíticas.

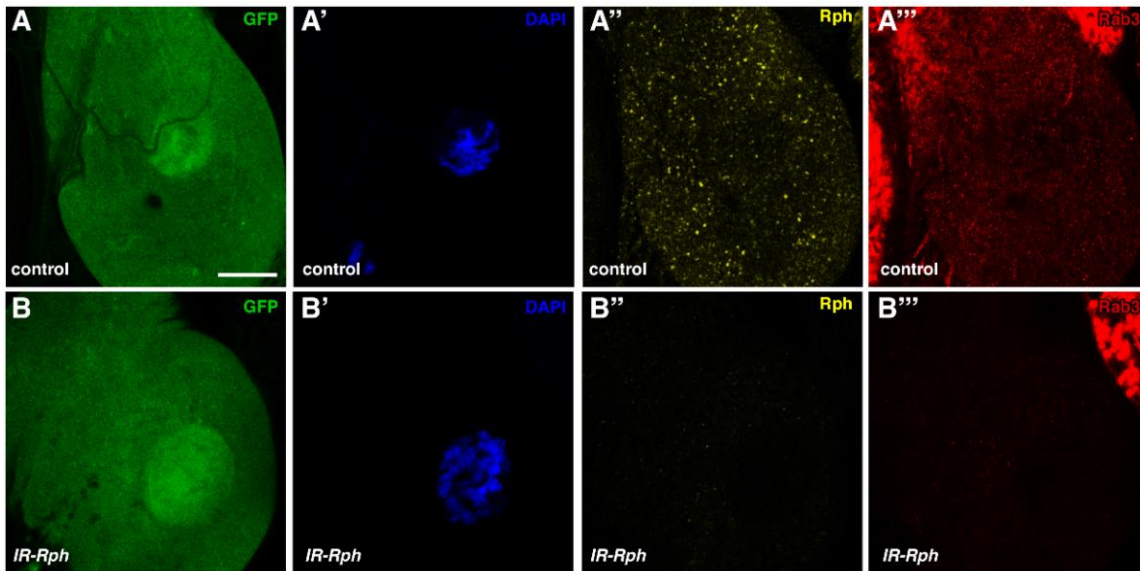


Figura 1.4. La interferencia de la expresión de *Rph* disminuye las vesículas de Rab 3. Doble inmunofluorescencia con anticuerpos contra *Rph* (A'' y B'') y Rab 3 (A''' y B'''), en nefrocitos controles (A-A''') e *IR-Rph* (B-B''') marcados con GFP (en verde) y DAPI (en azul). Escala = 10 μ m.

La eliminación de toxinas por parte de los nefrocitos como, por ejemplo, el nitrato de plata (AgNO_3) ingerido en la dieta, está mediada por la filtración y/o la endocitosis; la interrupción de estas funciones aumenta la mortalidad de las larvas alimentadas con AgNO_3 , lo que se traduce en un menor porcentaje de pupación. Para determinar si la expresión reducida de *Rph* afecta a esta función crucial de los nefrocitos, obtuvimos las curvas de supervivencia de larvas y moscas adultas *IR-Rph* alimentadas con dieta suplementada con AgNO_3 . Cuando las larvas se alimentaron con concentraciones crecientes de AgNO_3 , el porcentaje de pupación se redujo en las larvas *IR-Rph* en relación con los controles (Figura 1.5 B y Figura Anexo.1.1 E). En adultos, observamos una reducción en la vida media de las moscas *IR-Rph* (Figura Anexo 1.1 F) que no empeoró con la ingesta de AgNO_3 (Figura 1.5 A). Estos hallazgos indican que los niveles reducidos de *Rph* en los nefrocitos provocaron que las larvas fueran más susceptibles a la toxicidad inducida por AgNO_3 , lo que apoya que la endocitosis está alterada en las moscas *IR-Rph*.

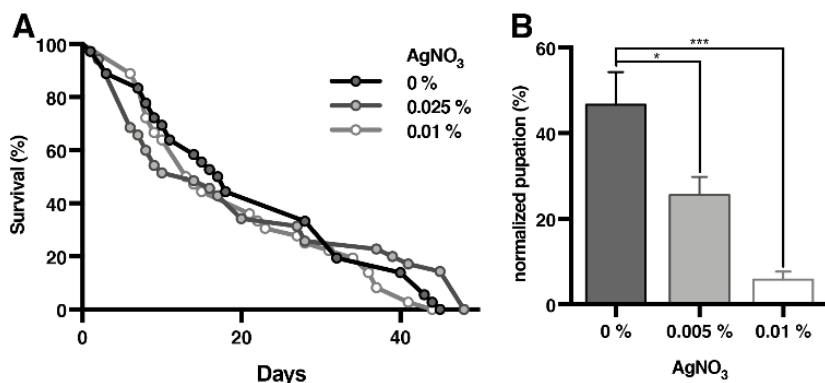


Figura 1.5. La interferencia de la expresión de *Rph* sensibiliza las larvas a la toxicidad del nitrato de plata.

(A) Las curvas de supervivencia de moscas *IR-Rph* alimentadas con comida estándar (0%) o suplementada con AgNO_3 (0.005% y 0.01%) no afectó la supervivencia de las moscas adultas *IR-Rph* *log-rank* (*Mantel-Cox*). (B) El porcentaje de pupación de moscas *IR-Rph* normalizadas con respecto a moscas control se redujo fuertemente en las larvas alimentadas con concentraciones de AgNO_3 al 0.005% y 0.01%. Test estadístico: *t* de *Student*. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$.

1.3.4 La interferencia de la expresión de *Rph* en los nefrocitos altera la reabsorción de las moléculas

El nefrocito combina la filtración con la reabsorción de proteínas, utilizando genes conservados evolutivamente y estructuras subcelulares, lo que apoya su utilidad como modelo simplificado tanto para los podocitos como para el túbulo proximal renal. Estudios previos han demostrado que los nefrocitos de *Drosophila* pueden captar proteínas fluorescentes de la hemolinfa, los cuales se pueden usar para conocer la actividad funcional de los nefrocitos *in vivo*.

Las moléculas de dextrano que circulan en la hemolinfa son filtradas, endocitadas y almacenadas por los nefrocitos, pero la eficiencia depende del tamaño de las partículas. Los nefrocitos forman dos capas distintas para el proceso de filtración, la membrana basal y el diafragma del nefrocito (ND) o hendidura de filtración del nefrocito. Los ND forman invaginaciones a través de la membrana llamadas canales laberínticos, que junto con las vacuolas endocíticas y los lisosomas constituyen la vía endocítica. En condiciones normales, las moléculas de dextrano por debajo de 70-kD cruzan fácilmente el ND y se endocitan en los canales laberínticos mediante el sistema Cubilin-Amnionless. Las moléculas de dextrano más grandes no pueden cruzar esta barrera y son endocitadas lentamente por la membrana basal. Los defectos en la endocitosis podrían inhibir la captación de proteínas, independientemente de su tamaño y los defectos en la estructura del ND podrían facilitar

el acceso de las moléculas de mayor tamaño a los canales laberínticos. Por lo tanto, la acumulación de dextrano fluorescente en los nefrocitos refleja la eficacia de la filtración y la endocitosis. Mediante la adición de dextranos marcados con fluorescencia de 10-kD (Figura 1.6 A-A'' y B-B'') y 70-kD (Figura 1.6 D-D'' y E-E'') a los nefrocitos de moscas adultas, observamos que incluso los tamaños más pequeños de dextrano no se acumularon en los nefrocitos *IR-Rph* (Figura 1.6 C y F). Estos datos indican que la expresión reducida de *Rph* altera la captación de moléculas por los nefrocitos.

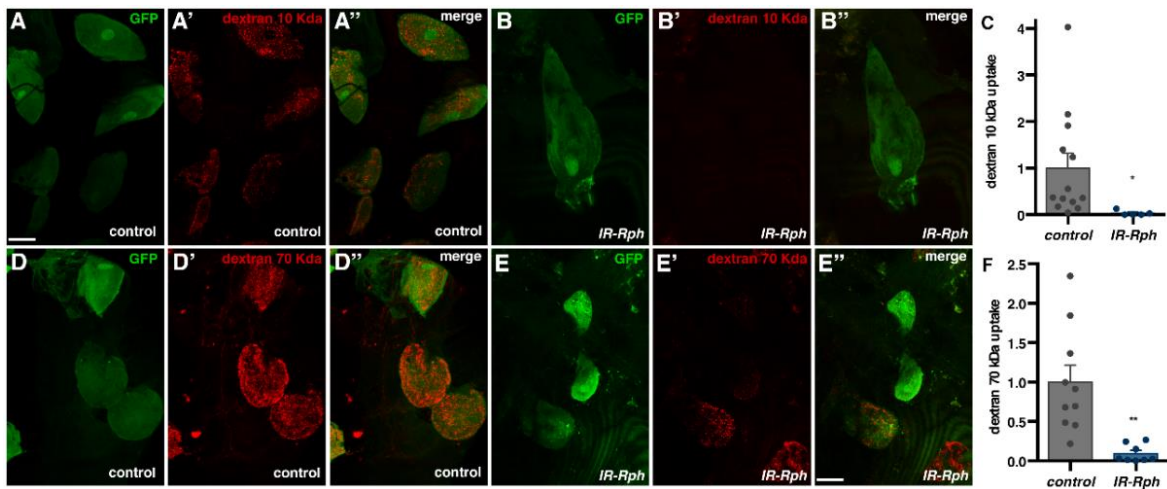


Figura 1.6. Rph es necesario para la captación eficiente de moléculas de peso molecular grande y pequeño. Adultos *Hand-Gal*> *UAS-GFP* (verde) alimentados con dextranos de 10- (A-A'' y B-B'') y 70-kD (D-D'' y E-E'') marcados con un fluoróforo (rojo) mostraron una retención diferencial de dextrano, con una captación altamente eficiente en el caso de los nefrocitos control (A-A'' y D-D'') y una captación deficiente en los nefrocitos *IR-Rph* (B-B'' y E-E''). Cuantificación de la captación de moléculas de dextrano (C y F). Escala = 30 μ m. Análisis estadístico: t de Student. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Cubilin (*Cubn*) y *Amnionless* (*AMN*) de *Drosophila* se expresan específicamente en nefrocitos y funcionan como co-receptores para la captación de proteínas y moléculas, de manera similar a su función en el túbulo proximal de los mamíferos. Para determinar una alteración en el sistema Cubilin-Amnionless, se realizó un análisis cuantitativo de la expresión de *Cubn* y *AMN*. El análisis cuantitativo de la expresión de los transcritos de estas dos proteínas mostró una reducción de la expresión de *Cubn* de alrededor del 50% en los nefrocitos *IR-Rph* (Figura 1.7 A). Además, se cuantificó la expresión de los transcritos de *Sns* y *Kirre*, que codifican proteínas que forman los poros de la hendidura de filtración (ND), en nefrocitos control y en nefrocitos *IR-Rph*. Mientras que no

hubo cambios en la expresión de *Kirre* (Figura 1.7 D), la expresión de *Sns* se redujo en un 20% en las moscas *IR-Rph* en comparación con los controles (Figura 1.7 C).

Para confirmar una reducción de la expresión de *Sns*, se visualizaron directamente preparaciones de nefrocitos de moscas *Sns-Gal4> UAS-GFP UAS-IR-Rph* bajo el microscopio de fluorescencia, y se observó una disminución de la señal en las moscas *IR-Rph* (Figura 1.7 E y F). El GFP emitido por los nefrocitos se cuantificó con un fluorómetro (Figura 1.7 G). Esta cuantificación apoya el papel de *Rph* en la regulación de la expresión de *Sns*.

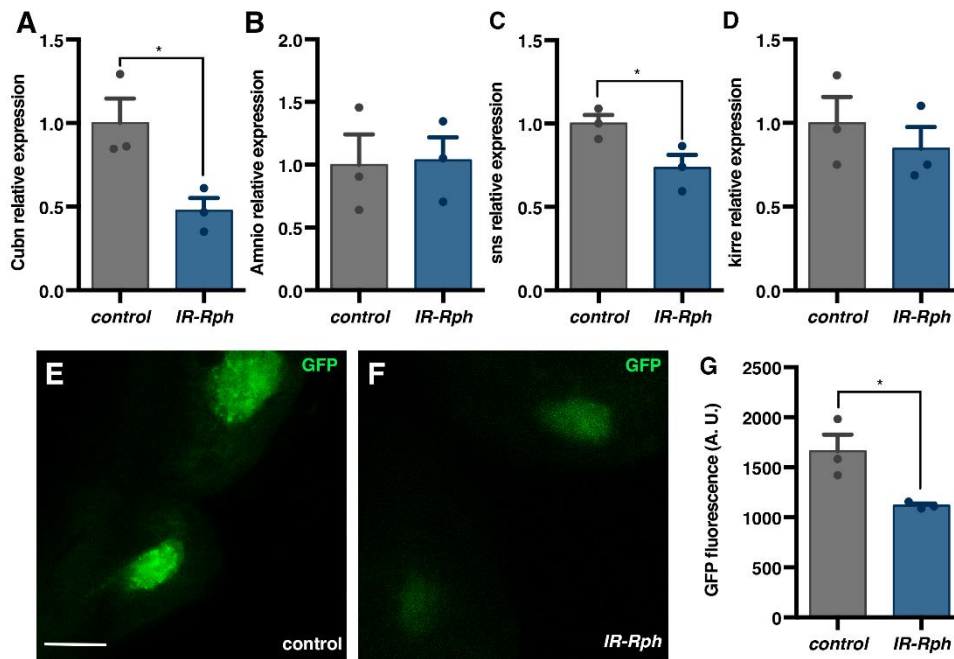


Figura 1.7. La reducción de la expresión de *Rph* produce una regulación negativa de los genes implicados en la vía endocítica. (A, B, C y D) RT-qPCR para cuantificar los niveles de expresión de diferentes genes específicos de nefrocitos en los genotipos indicados, en relación con los controles endógenos. (E y F) Imágenes confocales de moscas adultas que expresan el reportero GFP (verde) bajo el control de *Sns-Gal4*. (G) Unidades de fluorescencia medidas en moscas control (*Sns-Gal4> UAS-GFP UAS-IR-bcd*) e *IR-Rph* (*Sns-Gal4> UAS-GFP UAS-IR-Rph*). Escala = 10 μ m. Test estadístico: *t* de Student. * $p < 0.05$.

1.3.5 Se requiere *Rph* para mantener la estructura de los canales laberínticos

La hendidura de filtración (ND) es una estructura funcional clave en los nefrocitos y la alteración de los genes que la forman conduce a la muerte de éstos. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se utilizó para examinar la ultraestructura de los nefrocitos pericárdicos control e *IR-Rph*

(Figura 1.8). En comparación con los nefrocitos control (Figura 1.8 A), el número y el tamaño de los ND no se vio alterado en los nefrocitos de las moscas *IR-Rph* (Figura 1.8 B-C).

Sin embargo, los canales laberínticos estaban ausentes en los nefrocitos de estas moscas y la membrana basal estaba disgregada en algunas regiones. Además, el número de vesículas endocíticas y vacuolas se redujo significativamente, mientras que no hubo cambios en el número de lisosomas (Figura 1.8 D). De acuerdo con nuestros resultados con respecto a la alteración de la absorción de dextranos y la sensibilización a AgNO_3 , los cambios en la ultraestructura de los nefrocitos apoyan una interrupción del tráfico endocítico en los nefrocitos *IR-Rph*.

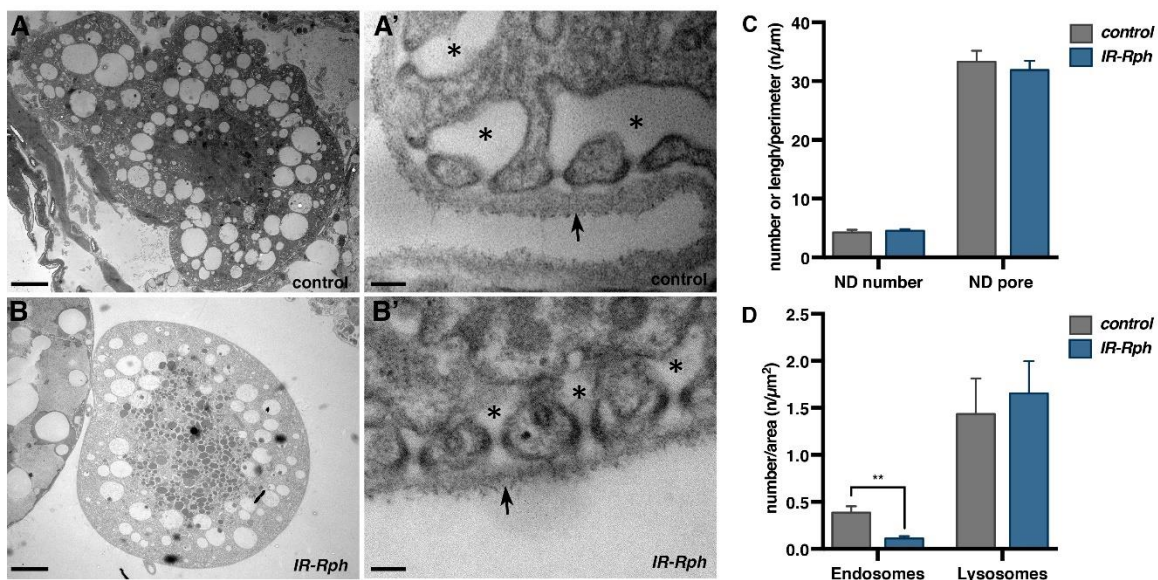


Figura 1.8. Rph es esencial para mantener los canales laberínticos. En comparación con las moscas control (A y A'), los nefrocitos *IR-Rph* (B y B') no tenían canales laberínticos (asterisco, *) y mostraban una membrana basal alterada (flecha en A' y B'). Sin embargo, el número de NDs y el tamaño de los poros no varió en estas moscas (C). Aunque el número de lisosomas fue el mismo, el número de endosomas se redujo en los nefrocitos *IR-Rph* (D). Barras de escala, 2 μm en A y B; 100 nm en A' y B'. Test estadístico: t de Student. ** p < 0.001.

1.3.6 El ácido retinoico rescata los defectos en la filtración y la endocitosis causados por la interferencia en la expresión de *Rph*.

El ácido retinoico (RA), un metabolito de la vitamina A que se adquiere directamente de la dieta ya que no puede ser sintetizado por el organismo, está implicado en procesos de diferenciación celular, proliferación, regulación de la apoptosis e inhibición de la inflamación¹⁷⁴. Se conoce que el RA,

interviene en la diferenciación de podocitos mediante la regulación de *KLF15*^{50,175-177}. La restauración de marcadores de diferenciación en los podocitos por parte del RA hace que este compuesto sea considerado como tratamiento para enfermedades renales.

Los nefrocitos no funcionales sufren un proceso de dediferenciación, la membrana celular se desorganiza y el núcleo acaba fragmentándose (Figura 1 B'''). La interferencia de la expresión de *Rph* provoca que los nefrocitos pierdan su función, lo que se traduce en una disminución en su número y supervivencia. En este trabajo, administramos RA, a distintas concentraciones, a moscas *IR-Rph*. Éstas tenían un número significativamente mayor de nefrocitos funcionales con respecto a moscas *IR-Rph* que fueron alimentadas con comida estándar (Figura 1.9 A). Además, estas moscas alimentadas con RA presentaron curvas de supervivencia significativamente más largas que las moscas que no tomaron el compuesto (Figura 1.9 B). Estos resultados sugieren que el RA podría estar mejorando la función de filtración o de reabsorción, o ambas, en los nefrocitos.

Para determinar si la recuperación de la funcionalidad de los nefrocitos podría deberse a la inhibición de la dediferenciación, como se ha descrito en podocitos¹⁷⁶, mediante la regulación de *klf15* o de *Rph*, realizamos un inmunoensayo contra Klf15 y Rph. En moscas *IR-Rph* alimentadas con comida suplementada con 10 μ M de RA (Figura 1.9 C-C''') la señal de klf15 (Figura 1.9 C') fue claramente superior a la señal de la misma proteína en comparación con moscas *IR-Rph* alimentadas con comida no suplementada (Figura 1.9 C'). Como era de esperar, para Rph, no se observaron cambios en la señal de esta proteína entre las moscas *IR-Rph*, sin suplementación de RA, (Figura 1.9 C'') y las moscas suplementadas con el compuesto (Figura 1.9 D''). Estos resultados indicarían que el RA regula la expresión de *Klf15* en los nefrocitos pericárdicos de *Drosophila*.

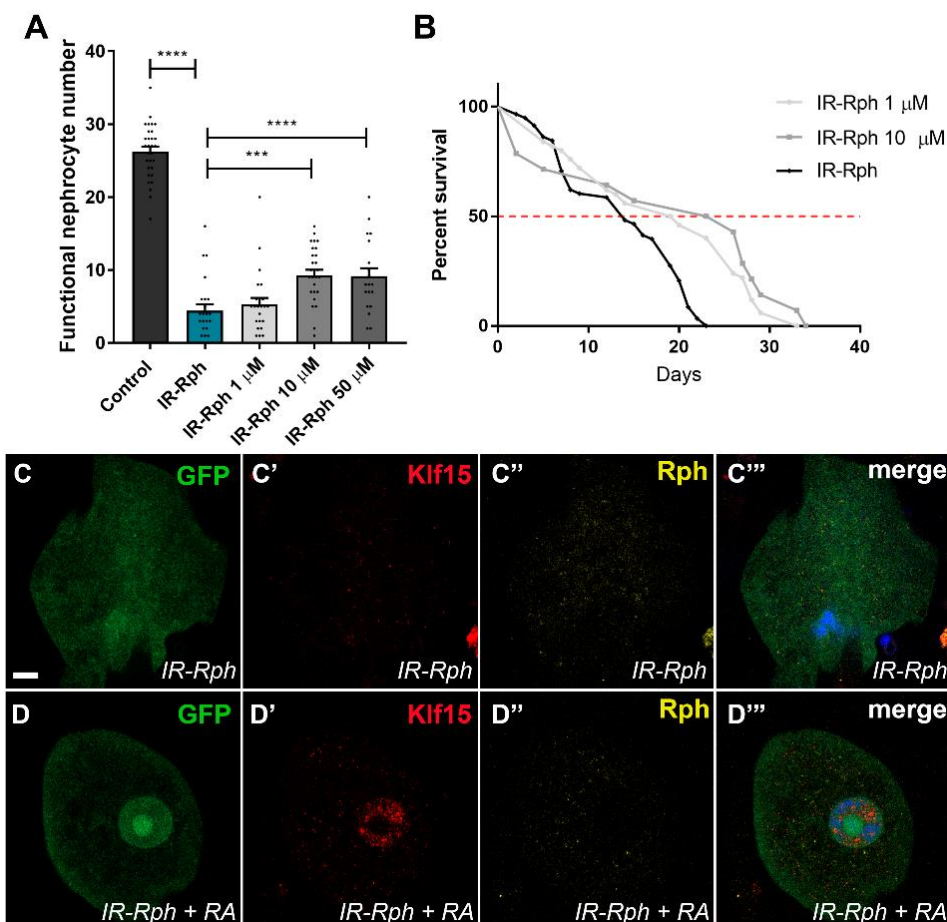


Figura 1.9. El ácido retinoico (RA) rescata el número de nefrocitos funcionales, la supervivencia y la expresión de *Klf15* de las moscas *IR-Rph*. A. Número de nefrocitos funcionales de moscas *IR-Rph* de 1 semana de edad en diferentes concentraciones de RA (1 μ M, 10 μ M y 50 μ M). Test estadístico: *t* de Student, $n \geq 20$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. B. Curvas de supervivencia de moscas *IR-Rph* alimentadas con medio nutritivo estándar (*IR-Rph*, línea negra) o suplementado con RA a 1 μ M o 10 μ M (*IR-Rph* 1 μ M e *IR-Rph* 10 μ M, línea gris débil y línea gris oscuro, respectivamente) (test estadístico: log-rank (Mantel-Cox)). C y D. Imágenes confocales de nefrocitos pericárdicos que expresan GFP (verde en C y D) y *UAS-IR-Rph* bajo el control de *Hand-Gal4*. La inmunotinción con anticuerpo anti-*klf15* (C', C'', D' y D'') reveló una señal más fuerte de *Klf15* en los nefrocitos tratados con 10 μ M de RA (*IR-Rph* + RA, D' y D'') que en los no tratados (*IR-Rph*, C' y C''). El RA no tuvo ningún efecto sobre la señal de Rph en los nefrocitos tanto no tratados como tratados con RA (A'', A''', B'' y B'''). Los núcleos se contrastaron con DAPI (azul). Escala = 10 μ m.

Como se ha dicho antes, una forma de conocer si alguna de estas rutas está dañada es mediante moléculas de dextrano de distinto tamaño marcadas con fluoróforos. Para conocer si el RA era capaz de rescatar alguna de estas rutas, se administró dextrano de 10-kD y 70-kD a moscas *IR-Rph*

alimentadas con comida normal o con 10 μ M de RA. Las moscas alimentadas con el compuesto lograron captar significativamente mayor cantidad de dextrano de 10-kD (Figura 1.10 C y C') comparado con las moscas sin tratamiento (Figura 1.10 A y A''). Además, el dextrano de mayor tamaño, de 70-kDa, también fue captado, aunque no a niveles de un nefrocito control (Figura 1.6). Estos resultados sugieren que el RA logra restablecer el proceso de filtración y parte de la endocitosis en los nefrocitos.

Al administrar RA a las moscas *IR-Rph*, los niveles de expresión del gen *Sns* así como del gen *Cubn* alcanzaron valores normales (Figura 1.10 A y C). Estos resultados sugieren que el compuesto rescata la función de filtración y endocitosis mediada por el complejo Cubn/AMN que está alterada en las moscas *IR-Rph*. Este rescate se debe posiblemente, como se ha mostrado en trabajos anteriores^{175,176}, a una regulación del factor *Klf15* que a su vez regula a *Sns*. Además, como muestran las imágenes de TEM, los nefrocitos de las moscas tratadas con RA recuperaron las estructuras de canales laberínticos (Figura 1.10 I y J) que están ausentes en las moscas *IR-Rph* sin tratamiento (Figura 1.8).

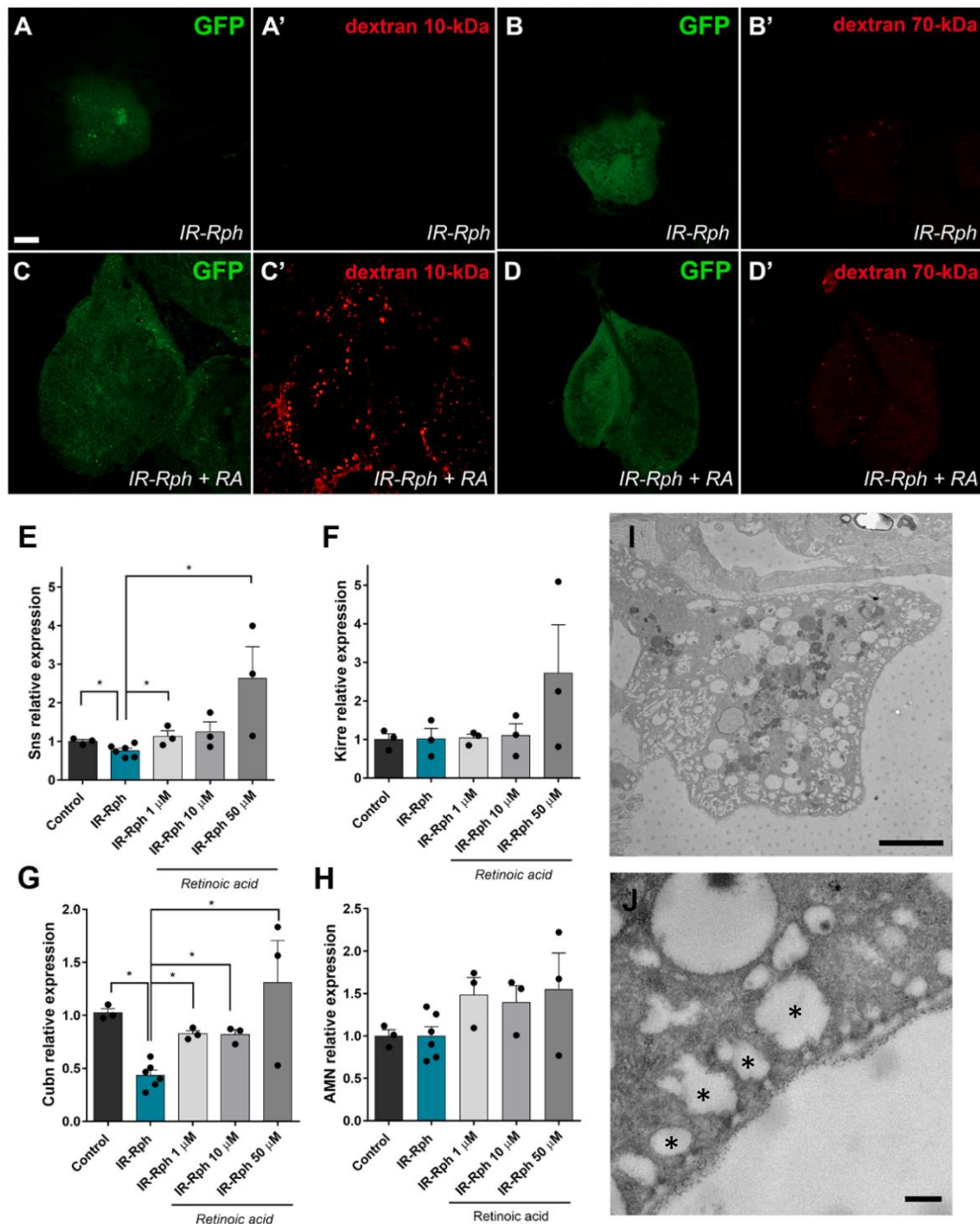


Figura 1.10. El RA rescata el proceso de filtración y la endocitosis en nefrocitos. A-D. Imágenes confocales de nefrocitos pericárdicos que expresan GFP (verde en A, B, C y D) y *UAS-IR-Rph* bajo el control de *Hand-Gal4*. Ensayo de captación de dextrano de 10-kD y 70-kD en moscas *IR-Rph* alimentadas con medio estándar (A, A', B y B', respectivamente) o suplementado con 10 μ M de RA (C, C', D y D'). Escala = 10 μ m. E-H. RT-qPCR para cuantificar los niveles de expresión de diferentes genes específicos de nefrocitos en los genotipos indicados (*Hand-Gal4* > *UAS-GFP*, control y *Hand-Gal4* > *UAS-GFP UAS-IR-Rph*) en relación con los controles endógenos. I y J. Imágenes de TEM de nefrocitos *IR-Rph* tratados con 10 μ M de RA, el asterisco (*) indica el canal laberíntico. Barra de escalas = 10 μ m, 4 μ m y 200 nm. Test estadístico t de Student. * p < 0.05.

1.4 Discusión

Se sabe que la expresión de *Rph-3A* está alterada tanto en enfermedades proteinúricas como en modelos humanos y de ratón¹¹⁰. Además, estudios previos han sugerido que un polimorfismo en el gen *RPH-3A* aumenta el riesgo de presentar microalbuminuria¹⁰⁹. Sin embargo, poco se sabe sobre el papel de esta proteína en los podocitos. Los nefrocitos de *Drosophila* filtran y captan proteínas a través de estructuras subcelulares y genes que se conservan evolutivamente. Esto convierte a los nefrocitos de *Drosophila* en un modelo simplificado para el estudio de los podocitos, que llevan a cabo el proceso de filtración, y del túbulo proximal renal, especializado en la reabsorción de proteínas¹⁶⁸. Aprovechando el alto grado de conservación de las estructuras de filtración entre los podocitos humanos y los nefrocitos de *Drosophila*, y la gran cantidad de herramientas genéticas disponibles en las moscas, hemos estudiado el papel de *Rph* en este sistema modelo y las consecuencias de silenciar su expresión.

En este estudio, mostramos que *Rph*, una proteína conocida por ser efectora de las proteínas *Rabs*, se expresa en los nefrocitos pericárdicos de *Drosophila* y tiene una función relevante en el filtrado de la hemolinfa y en el mantenimiento del estado diferenciado de estas células. Estudios previos directamente implicaron a *Rph-3A* en el tráfico de vesículas en neuronas¹¹³ y podocitos¹¹⁰. En consecuencia, en los nefrocitos observamos colocalización de *Rph* con marcadores de vesículas como *Hrs*, *Rab 3* y *Rab 27*, que son proteínas de vesículas relacionadas con endocitosis y exocitosis^{110,112,172,173}. Es importante destacar que las vesículas positivas para *Rab 3* se redujeron considerablemente en los nefrocitos *IR-Rph*, lo que sugiere un bloqueo de la endocitosis mediada por *Rab 3*. En consecuencia, los niveles reducidos de *Rph* en los nefrocitos de *Drosophila* sensibilizaron a las larvas a la toxicidad inducida por nitrato de plata. Es de destacar que no observamos toxicidad en moscas adultas, lo que respalda la hipótesis de que aunque los nefrocitos son el sistema principal para mitigar los ataques de xenotoxinas en las larvas, hay otras células que pueden compensar su pérdida en adultos⁴⁹.

Varios estudios muestran que la vía endocítica juega un papel importante en el desarrollo, mantenimiento y daño del podocito y puede conducir a alteraciones en la morfología celular^{69,129,178}. En relación con esta observación, nuestros datos respaldan el papel de *Rph* en el mantenimiento de los nefrocitos, que se evaluó mediante la reducción de la expresión del marcador de diferenciación terminal *Klf15*. La pérdida de nefrocitos y la variabilidad del volumen podrían ser una consecuencia directa de la falta de *Rph* en los nefrocitos para mantener su estado celular diferenciado. Así pues,

la interferencia en la expresión de *Rph* alteró el volumen de los nefrocitos, causando finalmente la pérdida de nefrocitos. La capacidad de Rph-3A para unirse a diferentes tipos de proteínas del citoesqueleto, como la alfa-actinina¹²⁰, que es esencial para el mantenimiento de la integridad de los podocitos, podría contribuir a este fenotipo. En consecuencia, hemos demostrado una reducción dependiente del tiempo en el número de nefrocitos en moscas adultas *IR-Rph*, que fue concomitante con la pérdida de la expresión de *Klf15*.

La reducción en los niveles de *Rph* también afecta a la expresión de genes directamente involucrados en la estructura del nefrocito. *Sns* y *Kirre* (ortólogos de *Nephrin* y *Neph1* humanos) interactúan a través de sus dominios extracelulares para formar el diafragma de nefrocito y son esenciales para la formación de los ND. El sistema *Cubilin*-*Amnionless* se encarga de la endocitosis de proteínas de pequeño tamaño a través de los canales laberínticos^{39,63}. Ambos sistemas pueden ser alterados por una reducción en la expresión del gen o por la mala localización de cualquiera de sus componentes.

Nuestros datos con TEM y los experimentos de captación de dextrano mostraron que los canales laberínticos están ausentes en los nefrocitos *IR-Rph* y confirmaron la interrupción de la endocitosis de moléculas, lo que sugiere un papel para *Rph* en la reabsorción de proteínas, presumiblemente por la modulación de la expresión de *Cubilin*.

La ausencia de expresión de *Sns* conduce a una reducción dramática del número de ND⁵⁴. En nuestro caso, las imágenes TEM no mostraron ningún efecto en el número de ND, probablemente porque la reducción en la expresión de *Sns* de los nefrocitos *IR-Rph* fue solo del 20%. En consecuencia, estudios recientes han mostrado la importancia de *Sns* citoplasmático en la regulación de la organización de la actina¹⁷⁹, la alteración de éste podría dar como resultado la alteración de la disposición de la actina cortical cuando las proteínas ND se pierden o se reducen. El mismo estudio destaca el papel de la regulación recíproca entre los componentes del citoesqueleto y las proteínas ND como esencial para el tamaño y la filtración dependiente de la carga.

Los nefrocitos tratados con RA mostraron niveles de expresión de *Sns* y *Cubn* similares a los nefrocitos control (Figura 1.10 E y G), presentaron canales laberínticos (Figura 1.10 I) y pudieron llevar a cabo la función de filtración (Figura 1.10 C') y parcialmente la endocitosis (Figura 1.10 D'). Estas restauraciones en los nefrocitos *IR-Rph* se deben probablemente a la regulación positiva de la expresión de *Klf15* mediante la administración de RA y demuestran que el mantenimiento del estado diferenciado de los nefrocitos rescata los fenotipos provocados por el silenciamiento de *Rph*.

Nuestros datos resaltan la relevancia de Rph en la estructura y función de los nefrocitos. Específicamente, la falta de Rph parece afectar el rendimiento de los nefrocitos a dos niveles: la filtración por alteración de la membrana basal y las modificaciones citoesqueléticas subsiguientes que conducen a importantes alteraciones estructurales (ausencia de canales laberínticos) y la pérdida de nefrocitos, y la captación de proteínas al influir en la expresión de *Cubilin* y el tráfico vesicular (Figura Anexo 1.5). Esto sugiere un doble papel para Rph-3A en el sistema excretor de los mamíferos y podría explicar por qué un polimorfismo en *RPH-3A* humano conduce a la microalbuminuria¹¹⁰. Es importante destacar que el patrón de expresión de *Rph-3A* en mamíferos no está bien descrito, y su presencia en diferentes tejidos, ya sea podocitos o túbulos proximales, podría influir en su actividad.

Finalmente, el papel de Rph en el mantenimiento de la estructura y la función de los nefrocitos abre una ventana para explorar la contribución de los polimorfismos en el gen *RPH-3A* al riesgo de desarrollar ERC.

CAPÍTULO 2.

La interferencia de la expresión de *Rabphilin* en el sistema cardíaco de *Drosophila* provoca cardiopatía.

Los resultados de este capítulo están incluidos en:

Selma-Soriano E., Artero R, Redón J y Llamusi B. "*Rabphilin* interference expression causes cardiomyopathy in *Drosophila*". Enviado a Scientific Reports.

CAPÍTULO 2.

La interferencia de la expresión de *Rabphilin* en el sistema cardiaco de *Drosophila* provoca cardiopatía.

Los resultados de este capítulo están incluidos en:

Selma-Soriano E., Artero R, Redón J y Llamusi B. “*Rabphilin* interference expression causes cardiomyopathy in *Drosophila*”. Enviado a Scientific Reports.

2.1 Introducción

Se conoce que hay una asociación directa entre la insuficiencia cardíaca (IC) y el desarrollo de la enfermedad renal crónica (ERC). Ambos pueden ser causa y consecuencia el uno del otro. Existe evidencia de que la ERC contribuye al daño cardíaco o la enfermedad cardiovascular (ECV) y, a su vez, la insuficiencia cardíaca contribuye a la aparición de la ERC¹³². Ambas afectaciones dañan gravemente la salud de los pacientes, lo que resulta en una disminución de la supervivencia o la esperanza de vida. Aunque se conocen múltiples factores, como la diabetes y la hipertensión^{132,180} que favorecen la aparición y progresión de ambas situaciones, todavía hay factores desconocidos que podrían explicar las diferencias encontradas entre los pacientes en la progresión de la IC y / o la ERC.

Tanto los cardiomiocitos como los podocitos, que son células especializadas del corazón y del riñón, respectivamente, necesitan de un adecuado tráfico vesicular para realizar su función correctamente. Estas células necesitan pequeñas proteínas Rab GTPasas y sus efectores, y cualquier alteración de ellas conduce a la aparición de cardiomiopatía¹⁴⁰ o ERC¹¹⁰. A su vez, para que las proteínas Rab funcionen correctamente, necesitan a sus efectores, uno de los cuales es *Rabphilin-3A* (*Rph-3A*), un efector implicado en las reacciones de transporte y fusión de vesículas¹¹³. En los humanos, el gen *Rph-3A* codifica una proteína que regula la exo- y endocitosis en neuronas y podocitos¹¹³ y las bases de datos *Human Protein Atlas* y *UniProt* describen que *Rph-3A* se expresa en corazón humano. En podocitos, esta proteína se encuentra alrededor de las vesículas que están cerca de la hendidura de filtración¹¹⁰. La parte NH2 terminal de *Rph-3A* interactúa con la α -actinina, una proteína del citoesqueleto, y promueve la formación de filamentos de actina. Este dominio podría proporcionar el vínculo entre la vesícula sináptica y el citoesqueleto que se requiere para la endocitosis^{110,113,120}. La parte terminal COOH de *Rph-3A* contiene dos dominios C2 que se unen a calcio y β -adduccin¹¹³. Estas proteínas del citoesqueleto son importantes para la integridad de los podocitos y la homeostasis¹¹⁰.

La expresión de *Rph-3A* se encuentra alterada en enfermedades proteinúricas de ratón y humanas, lo que sugiere que esta molécula tiene un papel relevante en las glomerulopatías¹¹⁰. Además, se ha descrito que un polimorfismo de esta proteína aumenta el riesgo de microalbuminuria en pacientes con daño cardíaco¹⁰⁹. En el capítulo anterior, describimos que *Rabphilin (Rph)* (ortóloga de la *Rph-3A* de humanos) participa en procesos de endocitosis y filtración de moléculas presentes en la hemolinfa del sistema excretor de *Drosophila*, específicamente en los nefrocitos. En este capítulo demostramos que *Rph* también se expresa en el corazón tubular de *Drosophila* y describimos las consecuencias sobre el sistema cardíaco cuando se interfiere la expresión de *Rph* en los nefrocitos. *Drosophila* tiene un sistema circulatorio abierto; sin embargo, tiene un tubo contráctil de 1 mm de longitud que funciona como un corazón. El corazón de *Drosophila* comparte homología en desarrollo y función con el corazón de vertebrados y se ha utilizado para estudiar enfermedades cardíacas humanas^{181–183}.

Dada la relación entre ambos, nefrocitos y corazón en el desarrollo de enfermedades, hemos estudiado el efecto de la interferencia de la expresión de *Rph* en tejidos específicos sobre la función cardíaca, diferenciando los efectos de la interferencia restringida a los nefrocitos o la interferencia combinada en ambos tipos celulares, cardiomiocitos y nefrocitos. Observamos que la falta de expresión combinada de este gen conduce a cambios estructurales y funcionales que resultan en una disminución de la supervivencia. Es de destacar que el impacto que tuvo la interferencia de la expresión de *Rph* restringida a los nefrocitos en la función cardíaca fue menos grave pero significativa. Nuestros datos apoyan el relevante papel de *Rph* tanto en los cardiomiocitos como en los nefrocitos en el mantenimiento de una función cardíaca adecuada, y respaldan estudios previos que sugieren una implicación funcional de los nefrocitos en la insuficiencia cardíaca^{52,184,185}.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Líneas de *Drosophila*

Las líneas *UAS-IR-Rabphilin* (número BDSC: 25950) y *yw* se obtuvieron de *Bloomington Drosophila Stock Center* (Universidad de Indiana), *Sns-Gal4 UAS-GFP* se obtuvo de Ruiz-Gómez M (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC y UAM). La línea recombinante *Hand-Gal4 UAS-GFP* se generó en nuestro grupo para marcar los nefrocitos y los cardiomiocitos. Todos los cruces se mantuvieron a 25 °C o 29 °C en medio nutritivo estándar.

2.2.2 Análisis de la supervivencia de *Drosophila*.

Se recolectaron más de 100 machos por genotipo, se transfirieron en tubos que contenían medio nutritivo estándar y se mantuvieron a 29 °C. El número de individuos muertos se cuantificó diariamente y las moscas se transfirieron a medio fresco cada 2-3 días. Las curvas de supervivencia se obtuvieron utilizando el método de Kaplan-Meier, y las comparaciones estadísticas de las curvas se llevaron a cabo de acuerdo con el análisis de *log-rank* (*Mantel-Cox*) ($\alpha = 0.05$).

2.2.3 Inmunofluorescencia

Los corazones adultos de hembras de 7 días de edad se diseccionaron en PBS 1 X de acuerdo con Selma-Soriano et al¹⁷⁰, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y se permeabilizaron con PBS que contenía 0.3% de Tritón-X (PBS-T) durante 10 minutos, 3 veces. Los corazones se bloquearon en una solución de PBS-T que contenía 0.5% de BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente y se incubaron con anti-*Rabphilin* humano (Abcam, ab3338). Después de 3 lavados con PBS-T, se incubó el anticuerpo secundario AlexaFluor-647 (Life Technologies, A31573) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal LSM 800 (Zeiss).

2.2.4 Análisis de los parámetros cardíacos

Los corazones de hembras de 1 semana de edad se diseccionaron como se describió anteriormente en Chakraborty M¹⁸⁶. Para la grabación, se utilizó un microscopio Leica con una cámara digital de alta velocidad, ORCA Flash, (Hamamatsu) y se tomaron grabaciones de 20 segundos a una velocidad mínima de 150 imágenes/segundo. Se midieron diferentes parámetros cardíacos utilizando el software SOHA¹⁸⁷. Los resultados se analizaron mediante la prueba estadística *t* de *Student* no pareada de dos colas ($\alpha = 0.05$).

2.2.5 Tinción con faloidina

Los corazones se diseccionaron en PBS 1 X y se incubaron con faloidina (1: 1000 en PBS-T, # P1951, Sigma) durante 20 minutos. Las muestras se montaron en el medio de montaje Vectashield (Vector). Todas las imágenes se tomaron con el microscopio confocal LSM 800 (Zeiss).

2.2.6 Histología

Los tórax y abdomen de las hembras de 1 semana se diseccionaron y fijaron como se describió anteriormente en Selma-Soriano et al¹⁷¹. Las muestras se fijaron en PFA al 1% y glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0.2 M durante 30 minutos y se fijaron posteriormente con tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas. Después de deshidratarse, los abdómenes se embebieron en resina epoxi. Se obtuvieron secciones semifinas (1.5 μ m) y ultrafinas utilizando un ultramicrotomo (Ultracut E, Reichert-Jung y Leica). Las secciones se utilizaron para cuantificar el grosor de la pared del corazón. Se evaluó un mínimo de 10 secciones de diferentes individuos usando el software *ImageJ*, y se realizaron tres mediciones diferentes del grosor de la pared de cada sección histológica.

2.3 Resultados

2.3.1 *Rabphilin* se expresa en el corazón de *Drosophila*

Para verificar la presencia de la proteína Rph en el tejido cardíaco de *Drosophila*, realizamos un ensayo inmunofluorescente con el anticuerpo anti-*rabphilin* humano para identificar la proteína Rph en el tubo cardíaco de las moscas control y utilizamos el sistema *UAS-Gal4* para expresar GFP en cardiomiocitos y nefrocitos para facilitar su detección (*Hand-Gal414* > *UAS-GFP* en la Figura 2.1 A-A''). Observamos previamente la expresión de *Rph* en nefrocitos, pero ahora confirmamos que *Rph* también se expresa en el tubo cardíaco de *Drosophila* con un patrón punteado en el citoplasma de los cardiomiocitos y con un patrón difuso en los núcleos de estas células (Figura 2.1 A-A''). Para garantizar la especificidad del anticuerpo, realizamos el mismo ensayo con moscas con interferencia de la expresión de *Rph* tanto en cardiomiocitos como en nefrocitos (*Hand-Gal4 UAS-GFP* > *UAS-IR-Rabphilin*, *IR-Rph*, Figura 2.1 B-B''), y observamos una reducción importante de la expresión de *Rph* en el tubo cardíaco. Del mismo modo, mostramos previamente la reducción de la señal de Rph en los nefrocitos tras la expresión de *IR-Rph*. Es importante destacar que la interferencia de la expresión de *Rph* restringida a los nefrocitos utilizando el *driver* específico de nefrocitos *Sns-Gal4*¹⁸⁸ (*Sns-Gal4 UAS-GFP* > *UAS-IR-Rabphilin*) no afectó a la expresión de la proteína Rph en el corazón, aunque la señal de Rph disminuyó en los nefrocitos pericárdicos (Figura 2.1 C-C'' y D-D'').

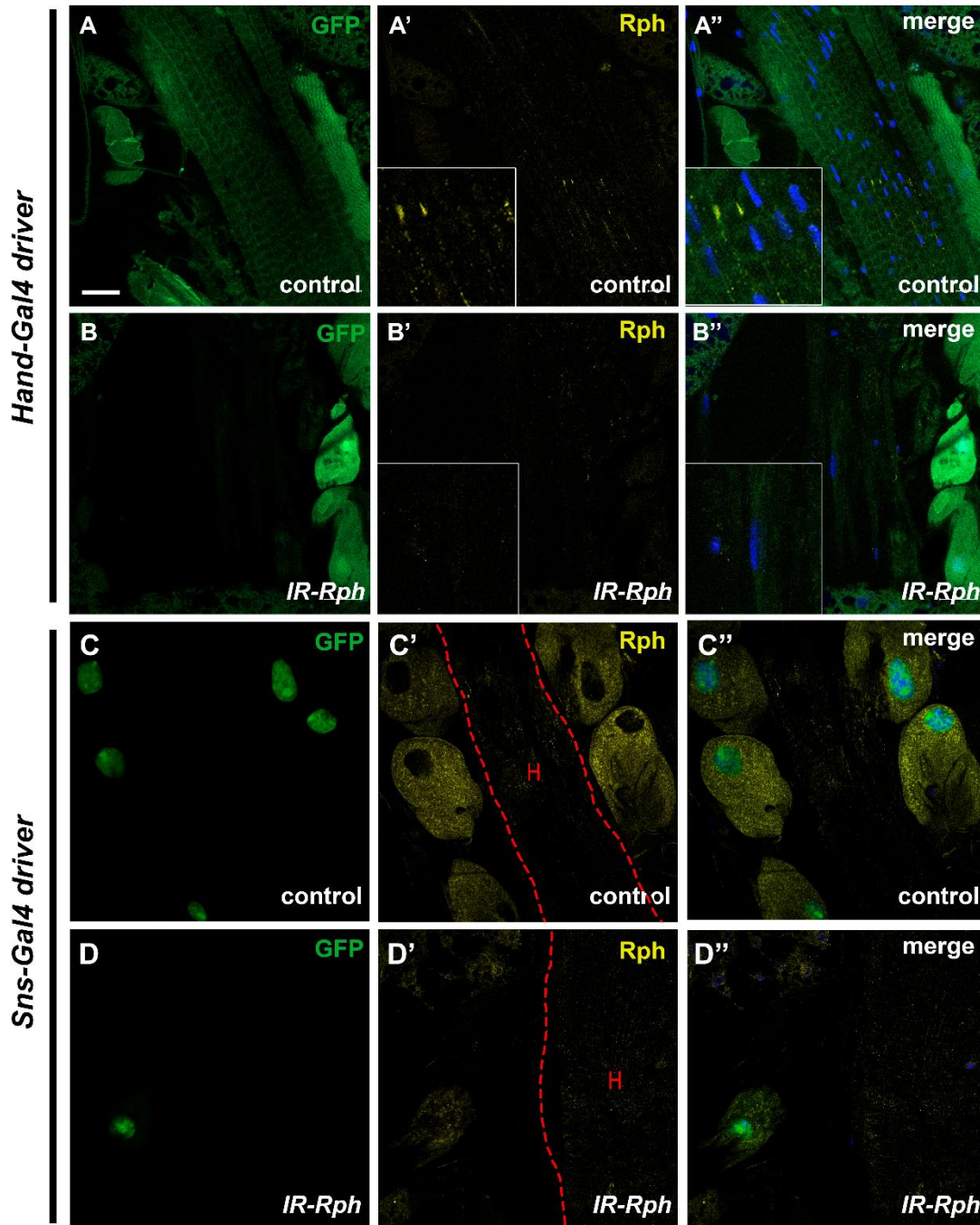


Figura 2.1. Rabphilin se expresa en cardiomiocitos de *Drosophila*. Imágenes confocales de corazones de moscas adultas control (A y C) y moscas *IR-Rph* (B y D) que expresan GFP bajo el control del driver *Hand-Gal4* (A y B) y *Sns-Gal4* (C y D). La inmunotinción con anticuerpo anti-Rabphilin (amarillo en A', B', C' y D') mostró presencia de Rph en el corazón de moscas control (A-A'' y C-C'') y moscas *IR-Rph* bajo el control de *Sns-Gal4* (D-D''); la señal se redujo significativamente en los cardiomiocitos de las moscas *IR-Rph* (B-B''). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las imágenes corresponden a la sección A4 del abdomen de *Drosophila*. H y la línea roja indica el corazón de *Drosophila*. Escala = 20 μ m.

2.3.2 La interferencia de la expresión de *Rph* en los cardiomiocitos y los nefrocitos altera la estructura del corazón.

Observamos previamente alteraciones en la ultraestructura de nefrocitos tras la interferencia de la expresión de *Rph* (Capítulo 1) utilizando el *driver Hand-Gal4*. Como se sabe que *Hand-Gal4* dirige la expresión con mayor intensidad en los cardiomiocitos que en los nefrocitos pericárdicos¹⁸⁴, también utilizamos este *driver* para estudiar el efecto de la interferencia de la expresión de *Rph* en la estructura del tubo cardíaco de *Drosophila*.

Realizamos una tinción con faloidina para ver la organización de las fibras de actina en el tubo cardíaco de *Drosophila* y observamos cambios en los diámetros de las paredes del corazón (Figura 2.2), y una interrupción significativa de la organización de las fibras (Figura 2.2 B), específicamente, el corazón mostró anomalías en la disposición de miofibrillas transversales en las moscas *IR-Rph* bajo el control de *Hand-Gal4* (Figura 2.2 B). Por el contrario, la interferencia de la expresión de *Rph* restringida a los nefrocitos, usando *Sns-Gal4*, no resultó en una desorganización de las fibras cardíacas (Figura 2.2 C y D), lo que apoya un papel de *Rph* en la organización de las fibras cardíacas que es independiente de la función de los nefrocitos.

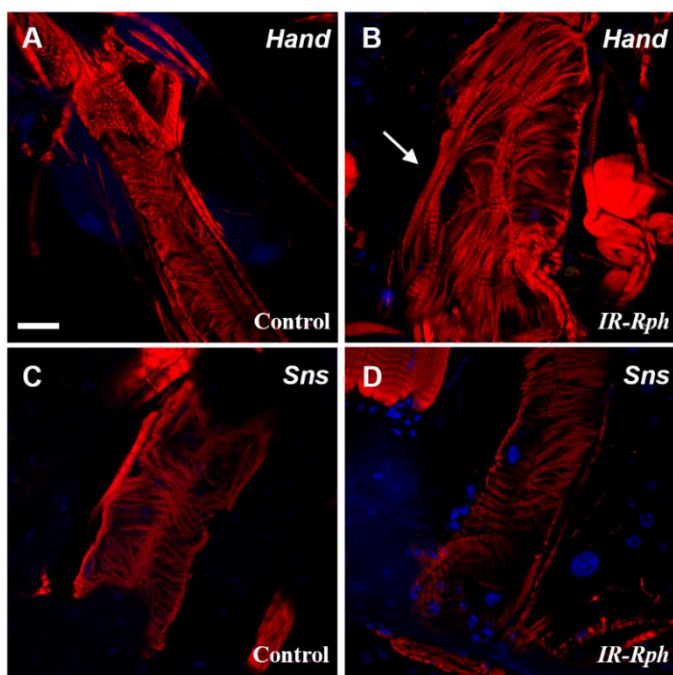


Figura 2.2. La interferencia de la expresión de *Rph* en el corazón promueve la interrupción de la disposición de las miofibrillas transversales. Imágenes confocales del corazón pertenecientes de la sección A1 del abdomen de una mosca adulta (cámara cónica) bajo el control de *Hand-Gal4* (A y B) y de *Sns-Gal4* (C y D). Tinción de faloidina (roja) de tubos cardíacos de *Drosophila* en moscas control (A, C) y moscas *IR-Rph* (B y D). La interferencia de la expresión de *Rph* en los cardiomiocitos (B) provoca una desorganización de las fibras de actina (flecha). Los núcleos se contrastaron con DAPI (azul). Escala = 20 μ m.

2.3.3 La interferencia de la expresión de *Rph* en los cardiomiocitos y los nefrocitos causa cardiomiopatía y reducción de la vida media.

Evaluamos la relevancia de la expresión de *Rph* en la vida media de las moscas silenciando la expresión de *Rph* en cardiomiocitos y nefrocitos utilizando el *driver Hand-Gal4* y estudiando las curvas de supervivencia en comparación con las moscas control. En adultos, la supervivencia media se redujo significativamente de 33.5 días en moscas control a solo 16.5 días en moscas *IR-Rph* ($p < 0.0001$) (Figura 2.3 A).

La pérdida de nefrocitos promueve defectos en la cardiogénesis y esto puede promover defectos en la función cardíaca^{189–191}. Por esta razón, contamos el número de nefrocitos pericárdicos en hembras adultas de 1 semana de edad. El número promedio total de nefrocitos pericárdicos no varió, aunque el número promedio de nefrocitos funcionales (nefrocitos con una fuerte señal positiva de GFP y núcleos intactos) en las moscas *IR-Rph* se redujo significativamente en comparación con los controles (Figura 2.3 B). Dado el fuerte impacto en la supervivencia y el número de nefrocitos inducido por la interferencia de la expresión de *Rph* en cardiomiocitos y nefrocitos, estudiamos los efectos de esta manipulación en la función cardíaca. Para estudiar la función cardíaca, se analizaron las contracciones cardíacas en corazones de moscas adultas de 1 semana de edad. Descubrimos que las hembras *IR-Rph* tenían un período cardíaco (*Heart Period*, HP) significativamente más largo en comparación con los controles (Figura 2.3 C), probablemente porque el intervalo diastólico (DI) fue significativamente mayor en estas moscas, aunque el intervalo sistólico (SI) no fue diferente (Figura 2.3 C). Es importante destacar que las moscas *IR-Rph* tuvieron un mayor diámetro diastólico y sistólico (EDD y ESD, respectivamente) con respecto a los controles (Figura 2.3 C y D), y que fracción de eyección (*Fractional Shortening*, FS) se vio reducida, aunque no significativamente (Figura 2.3 C). El índice de arritmia (AI), un indicador de la variabilidad calculada al dividir la desviación estándar del período cardíaco por su mediana, tampoco se modificó (Figura 2.3 C). Estos resultados indican que la *Rph* es necesaria para la función correcta del sistema cardíaco *Drosophila*.

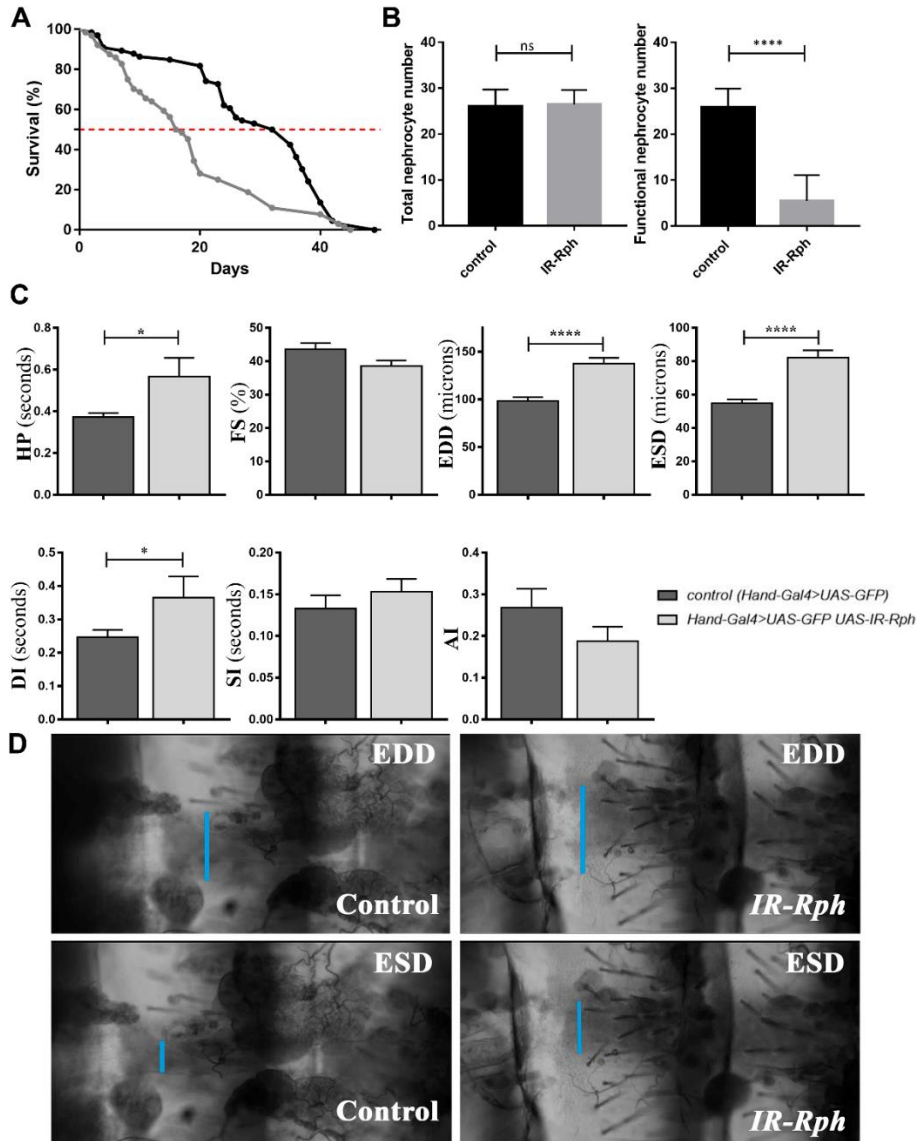


Figura 2.3. La interferencia de la expresión de *Rph* en cardiomiocitos y nefrocitos produce disfunción cardíaca en adultos de *Drosophila*. A. Las curvas de supervivencia de moscas control (línea negra) y moscas *IR-Rph* (línea gris) bajo el control del *Hand-Gal4*. El panel A muestra que la interferencia en la expresión de *Rph*, tanto en cardiomiocitos como en nefrocitos, afectó a la supervivencia de las moscas *IR-Rph* adultas. La línea roja horizontal marca la mediana de la supervivencia. B. Número promedio de nefrocitos pericárdicos totales y funcionales de moscas control y moscas *IR-Rph* de 1 semana de edad. C. Representación gráfica en diagrama de barras de los parámetros de la función cardíaca adulta. D. Micrografías representativas del abdomen de moscas diseccionadas que muestran el tubo cardíaco en la fase diastólica y sistólica. Las líneas azules marcan la distancia entre las paredes del corazón en las fases diástole y sístole (EDD y ESD, respectivamente). Análisis estadísticos *log-rank* (*Mantel-Cox*), *** p < 0.001 y *t* de *Student*. * p < 0.01, **** p < 0.0001.

2.3.4 Silenciamiento de la expresión de *Rph* solo en nefrocitos provoca un aumento en el diámetro diastólico y reducción de la vida media.

Se ha descrito que los nefrocitos contribuyen a mantener la función cardíaca normal en las moscas^{52,184,185}. Por lo tanto, también estudiamos el efecto de silenciar la expresión de *Rph* exclusivamente en nefrocitos. En moscas adultas que expresan la construcción interferente de *Rph* bajo el control de *Sns-Gal4*, la vida media se redujo levemente, pero de manera significativa ($p < 0.0001$) en comparación con las moscas control (de 28 a 25 días) (Figura 2.4 A). Curiosamente, el número promedio total y funcional de nefrocitos presentes en hembras adultas de 1 semana de edad fue el mismo para ambos genotipos (Figura 2.4 B).

Medimos los parámetros cardíacos en el caso de la interferencia de *Rph* solo en nefrocitos, usando el *driver Sns-Gal4*. En este caso, solo el diámetro diastólico (EDD) estaba alterado significativamente en comparación con los controles ($p = 0.006$, Figura 2.4 C y D). La EDD aumentó ligeramente en las moscas que expresaban el RNA de interferencia de *Rph* en los nefrocitos, mientras que el resto de los parámetros cardíacos analizados permanecieron sin cambios (Figura 2.4 C y D). La dilatación de la cámara cardíaca pareció ser una característica común de la interferencia de *Rph*, tanto en los cardiomiocitos y los nefrocitos como solo en los nefrocitos. Por lo tanto, esto sugiere que la actividad de nefrocitos podría tener una contribución relevante sobre este parámetro.

Estos datos indican que los efectos de la interferencia de *Rph* en la vida media y la función cardíaca son más fuertes cuando la interferencia afecta tanto a los cardiomiocitos como a los nefrocitos simultáneamente, y confirman la relevancia de la función de los nefrocitos en la función cardíaca, es decir, estos resultados sugieren que existe un efecto no autónomo a distancia.

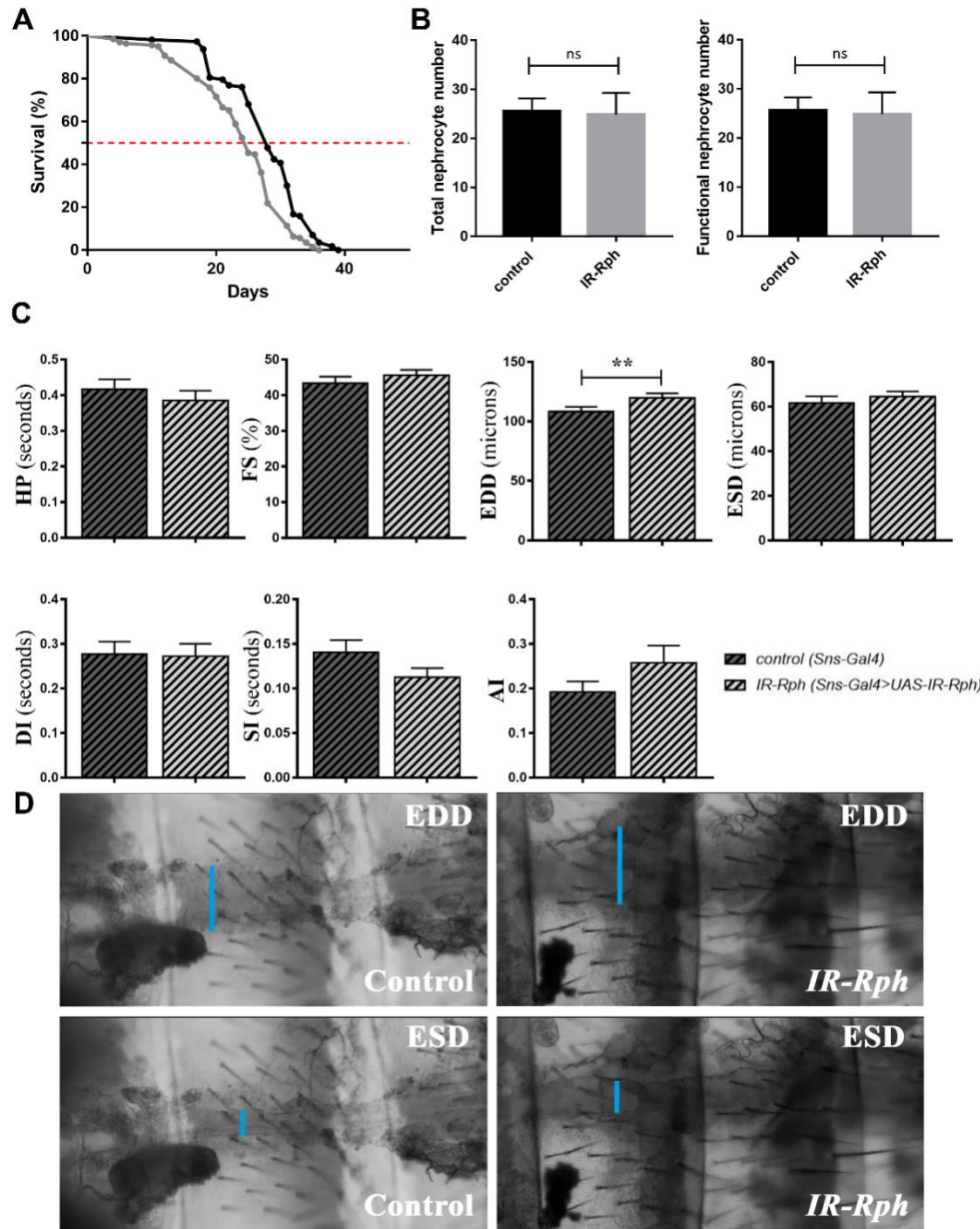


Figura 2.4. La interferencia de la expresión de *Rph* en nefrocitos pericárdicos produce una ligera extensión del diámetro diastólico en el corazón de *Drosophila*. A. Curvas de supervivencia de moscas control (línea negra) y moscas *IR-Rph* (línea gris) bajo el control de *Sns-Gal4*. El panel A muestra que la interferencia de *Rph* en los nefrocitos afectó a la supervivencia de las moscas *IR-Rph* adultas. La línea roja horizontal marca la mediana de supervivencia. B. Número promedio de nefrocitos pericárdicos totales y funcionales de moscas control y moscas *IR-Rph*. C. Representación gráfica en barras de los parámetros de la función cardíaca adulta. D. Micrografías representativas del abdomen de la mosca diseccionada que muestran el tubo cardíaco en las fases diastólica (EDD) y sistólica (ESD). Las líneas azules representan la distancia entre las paredes del corazón. Análisis estadísticos *log-rank* (Mantel-Cox), *** $p < 0.001$ y *t* de Student, ** $p < 0.01$.

Para una observación más detallada de la morfología del corazón de las moscas *IR-Rph*, examinamos secciones transversales semifinas del tubo cardíaco. En particular, estas secciones mostraron que el grosor de la pared del corazón en las moscas con interferencia de la expresión de *Rph* en el corazón era significativamente menor que el de las moscas control (Figura 2.5 A, A' y C). Sin embargo, el grosor de la pared del corazón de las moscas con interferencia solo en los nefrocitos no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa con respecto a las moscas control (Figura 2.5 B, B' y D). Estos resultados descartan la posible hipertrofia de los cardiomiocitos.

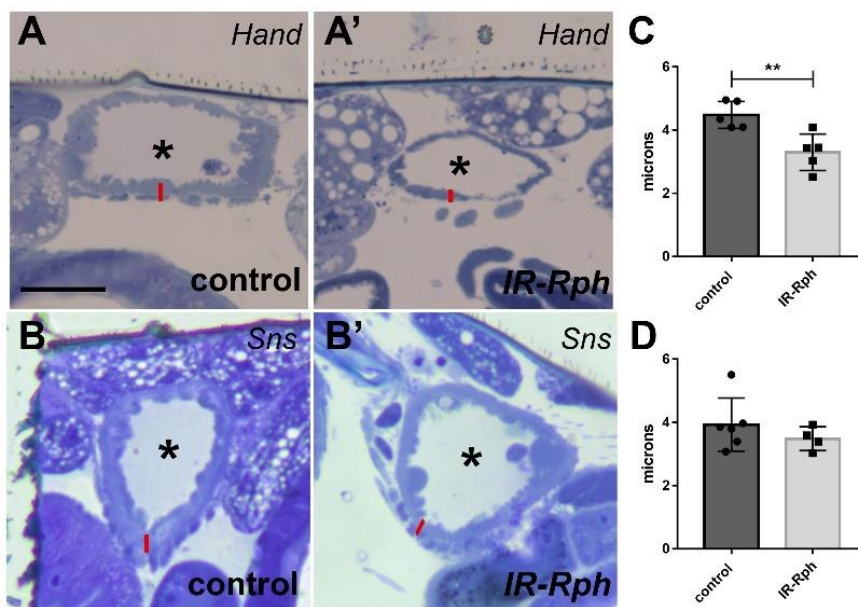


Figura 2.5. La reducción de la expresión de *Rph* tiene un impacto en el grosor de la pared del corazón de *Drosophila*. Secciones semifinas de corazones adultos control e *IR-Rph* bajo el control del *Hand-Gal4* (A y A', respectivamente) o *Sns-Gal4* (B y B', respectivamente). Las líneas rojas representan el área seleccionada para las mediciones del grosor de la pared del corazón en C y D. Cuantificación del grosor de la pared del corazón en moscas control y moscas *IR-Rph* bajo el control del *Hand-Gal4* (C) y *Sns-Gal4* (D). El asterisco (*) representa el lumen de la cámara del corazón. Escala = 25 μ m. Análisis estadístico *t* de Student, ** $p < 0.01$.

2.4 Discusión

El sistema circulatorio de *Drosophila* está compuesto por pares de cardiomiocitos que tienen fibras contráctiles orientadas circularmente; un músculo longitudinal ubicado dorsalmente, tubo cardíaco; y nefrocitos pericárdicos¹⁹². En las moscas, los nefrocitos se han descrito como análogos a los

podocitos de mamíferos y su función es filtrar toxinas y proteínas de la hemolinfa, la cual es el equivalente de la sangre de mamíferos³⁸. Estas células expresan genes conservados en podocitos humanos y células del túbulo proximal renal que son importantes para la reabsorción de proteínas y la endocitosis en invertebrados y mamíferos. Específicamente, mostramos aquí que *Rph*, una proteína bien conservada que actúa como efector de las proteínas Rab, se expresa en el corazón de *Drosophila*. Del mismo modo, mostramos previamente la expresión de *Rph* en nefrocitos pericárdicos (Capítulo 1) y podocitos humanos¹¹⁰.

La interrelación entre la ERC y la IC es evidente en humanos, pero la forma en que los podocitos (nefrocitos) influyen en la función cardíaca no está clara. Esta es una cuestión importante debido al potencial para comprender mejor la función de las señales extracelulares que afectan a la biología de los cardiomiocitos, con traslación directa a enfermedades humanas.

En *Drosophila*, se ha demostrado que los nefrocitos pericárdicos pueden ejercer un efecto paracrino en el sistema cardíaco¹⁸⁴. Aunque estudios recientes de Hartley et al. no detectaron cambios en la supervivencia y en el latido del corazón⁴⁶ cuando los nefrocitos estaban ausentes debido a la falta de expresión de *dkf15*^{49,50,185}, otros estudios han asociado la pérdida de nefrocitos a defectos en la cardiogénesis^{189–191}. En nuestro estudio, mostramos que la interferencia de la expresión de *Rph* en cardiomiocitos y nefrocitos pericárdicos tiene un fuerte impacto en la supervivencia probablemente debido a las alteraciones cardíacas, incluida la prolongación del intervalo diastólico y el agrandamiento de las cámaras cardíacas. El número de nefrocitos funcionales también se redujo en estas moscas. Estos efectos nocivos se redujeron significativamente cuando la interferencia de *Rph* se restringió a los nefrocitos, ya que solo se detectó un pequeño aumento en el diámetro diastólico y el número de nefrocitos no se alteró (Figura 2.6). Es importante destacar que, aunque pequeña, esta alteración fue suficiente para causar una reducción significativa de la vida media. Estos datos parecen respaldar que la función *Rph* en el tejido cardíaco es más importante para el rendimiento cardíaco y la supervivencia que su efecto en los nefrocitos. Sin embargo, nuestros datos también respaldan los estudios previos que muestran un mal funcionamiento cardíaco debido a alteraciones en los nefrocitos.

En el presente estudio, también demostramos que la interferencia de la expresión de *Rph* en ambos tejidos promueve la desorganización de la fibra de actina. Curiosamente, el gen *Rph-3A*, el homólogo de *Rph* de *Drosophila*, se une a la proteína actina del citoesqueleto y estimula la reorganización de los filamentos de actina^{113,120}. La desorganización de la actina podría estar contribuyendo al aumento de los diámetros diastólicos y sistólicos que observamos en las moscas con interferencia

de *Rph* y también podría ser la causa de la disminución del grosor de la pared en el corazón de *Drosophila*. De manera congruente, las mutaciones en los genes que forman parte del citoesqueleto, como la actina, los genes que controlan la interacción de la actina con otras proteínas y otras alteraciones en el citoesqueleto se han asociado previamente con la aparición de miocardiopatía dilatada^{193–195}, una enfermedad asociada con agrandamiento de las cámaras cardíacas en pacientes, específicamente, el ventrículo izquierdo. Es de destacar que la interferencia de *Rph* en los nefrocitos (bajo el control del *driver Sns-Gal4*) produjo un ligero aumento del diámetro diastólico sin causar una alteración evidente en la organización de la actina, lo que significa que el efecto a distancia de los nefrocitos podría ejercer pequeñas modificaciones en la morfología del corazón (Figura 2.6). No obstante, del número de nefrocitos funcionales no se redujo (a diferencia del silenciamiento de la expresión de *Rph* bajo el *driver Hand-Gal4*). Esto podría deberse al nivel de actividad del *driver Sns-Gal4*.

Se conoce que los nefrocitos regulan los niveles circulantes de múltiples proteínas, como por ejemplo la *Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine* (SPARC) que es una proteína involucrada en la función cardíaca de mamíferos⁵². De una forma similar, el efecto a distancia entre los nefrocitos pericárdicos y el corazón, visto en este trabajo, podría deberse a un efecto no autónomo desencadenado por la disfunción de los nefrocitos que alteraría los niveles de proteínas y moléculas presentes en la hemolinfa y con actividad reguladora sobre el corazón.

Nuestro trabajo sugiere un papel relevante para la *Rph* tanto en el corazón como en los nefrocitos, lo que sugiere una posible implicación en la homeostasis entre estos dos tejidos, y abre la puerta a considerar la relevancia biomédica de las alteraciones genéticas de este gen presente en humanos.

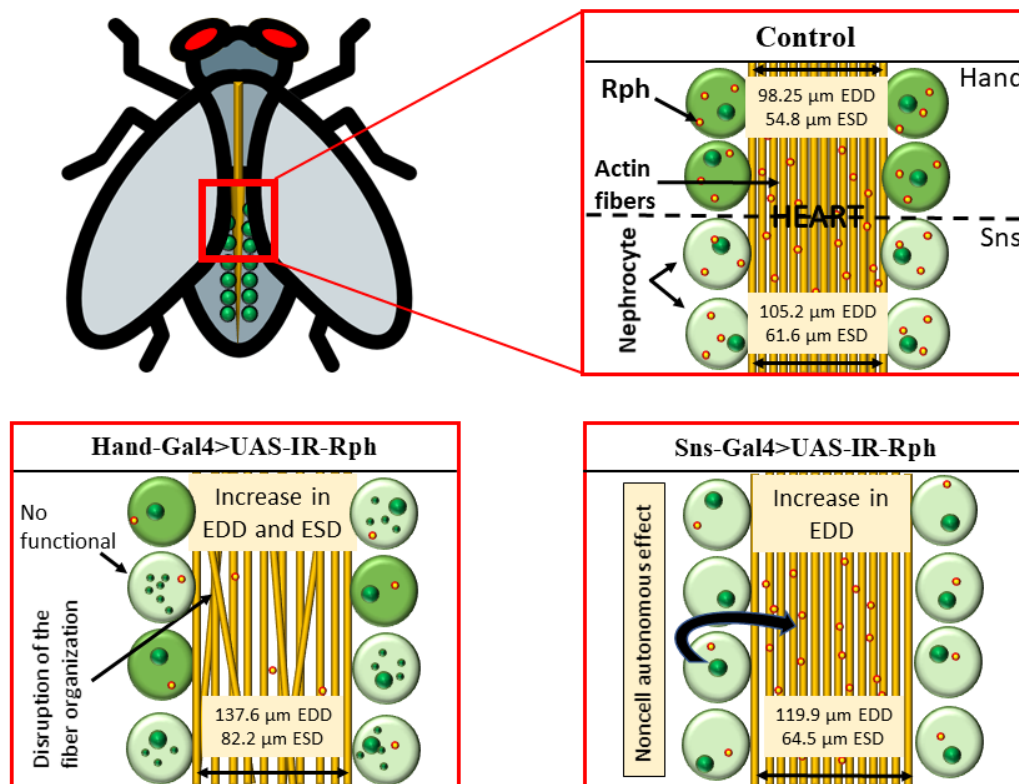


Figura 2.6. Modelo gráfico de las alteraciones cardíacas debido a la interferencia de la expresión de *Rph* en el corazón y los nefrocitos pericárdicos de *Drosophila*. La interferencia de la expresión de *Rph* en el corazón (dirigida por *Hand-Gal4*) promueve un aumento del EDD y ESD, desorganización de las fibras cardíacas y una reducción en la supervivencia. La interferencia de la expresión de *Rph* en los nefrocitos (dirigida por *Sns-Gal4*) provoca un aumento en la EDD, lo que indica la presencia de un efecto paracrino.

CAPÍTULO 3

Rab 3 y Rab 27 son necesarios para la función y la estructura de los nefrocitos y están implicados en nefropatía diabética en *Drosophila*

Los resultados de este capítulo están incluidos en:

Selma-Soriano E., Redón J y Artero R. Manuscrito en preparación.

CAPÍTULO 3

Rab 3 y Rab 27 son necesarios para la función y la estructura de los nefrocitos y están implicados en nefropatía diabética en *Drosophila*

3.1 Introducción

El sistema excretor de *Drosophila melanogaster* está formado por los túbulos de Malpighi y por los nefrocitos pericárdicos y de Garland⁴⁰. Los nefrocitos guardan una alta similitud funcional, estructural y molecular con los podocitos de los mamíferos y las células del túbulo proximal³⁸. Así pues, los nefrocitos realizan funciones de detoxificación de moléculas y partículas presentes en la hemolinfa^{38,40,169}. Esta detoxificación conlleva procesos de filtración, reabsorción y endocitosis de moléculas. La función de filtración es llevada a cabo a través del poro de los nefrocitos (ND) formado por las proteínas Stick-and-stones y Kirre, homólogas a Nephrin y Neph1 en humanos^{38,196,197}. El ND/SD marca el límite del tamaño de las moléculas que pueden ser filtradas⁵⁴. En condiciones normales solo las moléculas de tamaño pequeño pueden pasar por este poro de 40 nm hasta llegar a los canales laberínticos, donde las partículas son endocitadas o reabsorbidas por el complejo Cubilin-Amnionless⁶³. Las moléculas de tamaño molecular grande que no pueden ser filtradas a través del ND son endocitadas directamente a través de la membrana del nefrocito. En el proceso de tráfico de las vesículas con el cargo endocitado intervienen las proteínas Rab GTPasas con sus efectores¹²⁸. El tráfico vesicular es crítico para el desarrollo, la diferenciación y homeostasis del podocito^{129,179,198} y del nefrocito¹²⁸ así como para la función de endocitosis y filtración a través de los SD o ND, respectivamente^{69,85,128,199}. Las proteínas Rab son reguladoras, coordinadoras y organizadoras del transporte vesicular a través del citoesqueleto de todos los tipos celulares, entre ellos los nefrocitos¹²⁸ y los podocitos. Se conoce que Rab 3 y su efector Rabphilin están alterados en enfermedades renales en podocitos de ratón y humano¹¹⁰ y en *Drosophila*¹²⁸ (Capítulo 1 de esta memoria). La interferencia de la expresión de *Rabphilin* disminuye los niveles de Rab 3 en los nefrocitos lo cual se traduce en una disminución de la actividad de la ruta endocítica (Capítulo 1 de esta memoria). Además, en enfermedades proteinúricas la expresión de Rab 3 está aumentada en humanos¹¹⁰. A pesar de estos resultados, se conoce poco acerca de la función de las proteínas Rab y sus implicaciones en enfermedades renales. La gran similitud entre el nefrocitos y los podocitos y las células del túbulo proximal de mamíferos ha permitido usar a *Drosophila* como modelo para el estudio de enfermedades renales^{5,39,168} como el síndrome nefrótico resisten a esteroides

(SRNS)^{39,95,96}, la nefropatía diabética^{88,100,200}, enfermedades del túbulo proximal⁶³ y daño renal agudo (AKI)²⁰¹.

En el presente estudio, hemos caracterizado la función de las proteínas Rab 3 y Rab 27 y la implicación de ellas cuando se sobre-activa o infra-activa su función en los nefrocitos, así como el papel que ejercen en un modelo de nefropatía diabética.

Nuestros resultados indican que alteraciones en la función de estas Rabs tienen implicaciones en el mantenimiento de estructuras específicas del nefrocito como los ND y los canales laberínticos. Concretamente, la falta de función de Rab 3 provocó que los ND y los canales laberínticos estuvieran desorganizados impidiendo una correcta filtración y endocitosis de moléculas presentes en la hemolinfa. La falta de función de Rab 27 tuvo también los mismos efectos que Rab 3, aunque en este caso no fueron tan drásticos. Finalmente, en este estudio demostramos que Rab 3 se encuentra sobre-expresada en el modelo de nefropatía diabética y que la activación constitutiva de ésta revierte la toxicidad inducida por los altos niveles de azúcar presentes en la hemolinfa.

3.2 Material y métodos

3.2.1. Líneas de *Drosophila*

Hand-Gal4, *UAS-IR-Rph* (número BDSC: 25950), *UAS-GFP*, *DN UAS-Rab3* (número BDSC: 9766), *CA UAS-Rab3* (número BDSC: 9765), *DN UAS-Rab27* (número BDSC: 23267), *CA UAS-Rab27* (número BDSC: 9811) y *yw* se obtuvieron del *Bloomington Drosophila Stock Center* (Universidad de Indiana), *Sns-Gal4 UAS-GFP* se obtuvo de Ruiz-Gómez M (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC y UAM). La línea recombinante *Hand-Gal4 UAS-GFP* se generó en nuestro laboratorio anteriormente (capítulos 1 y 2). Todos los cruces se mantuvieron a 25 °C en medio nutritivo estándar. Para las moscas modelo de nefropatía diabética, hembras adultas recién nacidas se mantuvieron en medio suplementado con una concentración 1 M de sacarosa, al menos, durante 1 semana.

3.2.2. Cuantificación del volumen y el número de nefrocitos

Para el análisis del volumen de los nefrocitos, se diseccionaron corazones de mosca hembra de 1 semana de edad en PBS 1 X. Se obtuvieron imágenes con el microscopio confocal Zeiss LSM 800 utilizando un objetivo de aire 10x. Las estructuras 3D se reconstruyeron a partir de imágenes confocales utilizando el software IMARIS 7.1 (Bitplane). Para la cuantificación, las características de las imágenes confocales fueron invariables dentro de cada experimento. Para el análisis del número

de nefrocitos funcionales, solo se contabilizaron las células positivas para GFP con núcleos intactos. Los resultados se analizaron mediante el análisis estadístico *t* de *Student* no pareada de dos colas ($\alpha = 0.05$), aplicando la corrección de *Welch* cuando fue necesario.

3.2.2. Inmunofluorescencia

Los abdómenes de hembras de 1 semana de edad se diseccionaron en PBS 1X según el protocolo de Selma-Soriano et al. 2018¹⁷⁰, se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA) en PBS durante 20 min y se permeabilizaron lavando 3 veces con PBS suplementado con 0.3% de Tritón-X (PBS-T) durante 10 minutos cada uno. Luego, los corazones con nefrocitos pericárdicos se bloquearon en PBS-T que contenía BSA al 0.5% durante 30 minutos a temperatura ambiente y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (1: 100 o 1:50) durante toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-Rph (Abcam, ab3338; con 50% de similitud), anti-Rab 3 (BD Bioscience) anti-Rab 27 (BD Bioscience), anti-Klf15 (Abcam, ab22851; con 59% de similitud), y anti-Sns y anti-Kirre (obtenidos del grupo de la Dr. Abmayr, Stowers Institute). Después de 3 lavados con PBS-T, los anticuerpos secundarios (1: 200), AlexaFluor-647 (Life technologies, A31573), anti-ratón biotinilado (Sigma-Aldrich, B7264) y anti-conejo biotinilado (Sigma- Aldrich, B8895) se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Los corazones con nefrocitos pericárdicos se incubaron con solución ABC (kit ABC, VECTASTAIN) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavados e incubación con estreptavidina-TexasRed (Vector, 1: 500). Todas las imágenes se tomaron con un microscopio confocal LSM 800 (Zeiss) y se procesaron con el software ZEN 7.1.

3.2.3. Ensayo de toxicidad

Se transfirieron 20 larvas de primer estadio (L1) de cada genotipo a viales suplementados con 0.01% de AgNO₃ y se mantuvieron a 25 °C. El número de larvas que alcanzaron el estado pupal se cuantificó para determinar la toxicidad. Los resultados se analizaron mediante el análisis estadístico *t* de *Student* no pareada de dos colas ($\alpha = 0.05$), aplicando la corrección de *Welch* cuando fue necesario. El experimento se realizó al menos con 5 réplicas.

3.2.4. Análisis de la supervivencia de *Drosophila*.

Se recogieron más de 50 machos recién nacidos por genotipo, se transfirieron a tubos que contenían medio suplementado con AgNO₃ al 0.01% o con 1 M de sacarosa y se mantuvieron a 29 °C. El número de muertes se registró diariamente y las moscas se transfirieron a medio fresco cada 2 o 3 días. Las

curvas de supervivencia se obtuvieron utilizando el método de *Kaplan-Meier*, y el análisis estadístico de las curvas de supervivencia se llevó a cabo de acuerdo con la prueba de *log-rank (Mantel-Cox)* ($\alpha = 0.05$).

3.2.5. Análisis *in vivo* de la filtración y la captación de moléculas de dextrano

Se diseccionaron corazones de hembras adultas en hemolinfa artificial y se incubaron con 0.1 mg / ml de dextrano de 10-kD (AlexaFluor568, Invitrogen) o con 0.1 mg / ml de dextrano de 70-kD (ThermoFisher, D1830). Después de 15 minutos de incubación, los corazones con nefrocitos pericárdicos se lavaron 3 veces con PBS 1 X. Inmediatamente, el tejido, con los nefrocitos pericárdicos, se montó para obtener imágenes confocales (LSM 800, Zeiss). Se analizaron como mínimo 2 nefrocitos de al menos 3 moscas de cada genotipo. Los resultados se analizaron mediante el test estadístico *t* de *Student* no pareada de dos colas ($\alpha = 0.05$).

3.2.6 Cuantificación de niveles de transcritos mediante PCR en tiempo real.

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-qPCR), el ARN se aisló primero usando el reactivo Trizol (Invitrogen) de 50 corazones adultos, de 1 semana de edad, diseccionados con nefrocitos. La pureza y concentración del ARN se determinó con Nanodrop-1000 (Thermo Scientific). El ARN total (1 μ g) se transcribió inversamente con Superscript II (Invitrogen). La RT-qPCR, mediante SYBR-Green, se realizó con el sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5 (Applied Biosystems). Rp49 y Tub48B se usaron como genes de referencia endógena. En todos los casos, la expresión relativa de los genes endógenos y del grupo control se obtuvo mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se compararon pares de muestras utilizando la prueba estadística *t* de *Student* no pareada de dos colas ($\alpha = 0.05$), aplicando la corrección de *Welch* siempre que fuera necesario. El experimento se realizó por triplicado.

3.2.7. Ensayos de luminiscencia y fluorescencia

Para el ensayo de luciferasa, se homogeneizaron 5 machos con 200 μ l de tampón CCL 1 X (kit Promega E1500). Se transfirieron 40 μ l del homogenizado a una placa de 96 pocillos con 20 μ l de luciferina (kit Promega E1500) y se midió la señal de luminiscencia con un lector de microplacas (Infinite M200 Pro, TECAN). El experimento se realizó al menos con 5 muestras biológicas. Para el ensayo de fluorescencia, se diseccionaron abdómenes de hembras de 1 semana de edad en PBS 1X. Inmediatamente, se montaron los corazones con nefrocitos pericárdicos para la obtención de

imágenes confocales (LSM 800, Zeiss). Se analizaron al menos 2 nefrocitos de 7 moscas de cada genotipo. Los resultados se analizaron mediante la prueba estadística *t* de *Student* no pareada de dos colas ($\alpha = 0.05$).

3.2.8. Análisis de las estructuras celulares del nefrocito de imágenes tomadas con microscopio electrónico de transmisión (TEM)

Se diseccionaron y procesaron abdómenes con el corazón y los nefrocitos pericárdicos de hembras de 1 semana de edad como se describió previamente en Selma-Soriano et al. 2018¹⁷¹. Los abdómenes se fijaron en PFA al 1% y glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0.2 M durante 30 minutos y se fijaron posteriormente con tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas. Después de deshidratarse, los abdómenes se embebieron en resina epoxi. Se obtuvieron secciones semifinas (1.5 μm) y ultrafinas utilizando un ultramicrotomo (Ultracut E, Reichert-Jung y Leica). Las muestras se analizaron usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 a un voltaje de 80 kV.

El número de ND de los nefrocitos se analizó con imágenes de TEM a un aumento de X8000. El tamaño del poro se midió a tres niveles diferentes (sitio de poro más interno, medio y exterior) en imágenes con un aumento de X30000. El número de endosomas y lisosomas se obtuvo a partir de imágenes X800 que contenían una sección de las células completas. El experimento se realizó por triplicado. Los resultados se analizaron mediante la prueba estadística *t* de *Student* no pareada de dos colas ($\alpha = 0.05$).

3.3 Resultados

3.3.1 Las proteínas Rab 3 y Rab 27 son necesarias para el mantenimiento del estado funcional de los nefrocitos pericárdicos.

Una de las formas de saber si el nefrocito presenta fallos en su función de filtración y reabsorción de moléculas es observar o determinar cambios en su volumen o su tamaño, lo cual es indicativo de una alteración en el citoesqueleto¹⁰⁰. Para ello, tomamos imágenes con el confocal y reconstruimos las imágenes 3D con el software Imaris, observamos que el volumen medio de los nefrocitos que expresaban las construcciones de activación constitutiva (CA) para las Rab 3 y 27 era significativamente mayor con respecto a los nefrocitos control (Figura 3.1 A). Además, estos

nefrocitos presentaron índices de dispersión de volumen, calculado como SD volumen/mediana, significativamente superiores comparado con el control (Figura 3.1 B). Con respecto a las construcciones dominante negativa (DN) de las proteínas Rab, los nefrocitos con expresión de Rab 27 DN presentaron un volumen medio inferior al control, mientras que los nefrocitos con expresión Rab 3 DN mostraron un volumen medio igual (Figura 3.1 A). No obstante, los índices de dispersión de volumen de ambos genotipos fueron significativamente superiores con respecto al control (Figura 3.1 B). Estos resultados sugieren que alteraciones en el grado de función de las Rabs (ya sea por una falta o ganancia de función) tienen un impacto en el volumen del nefrocito y por consiguiente en su función.

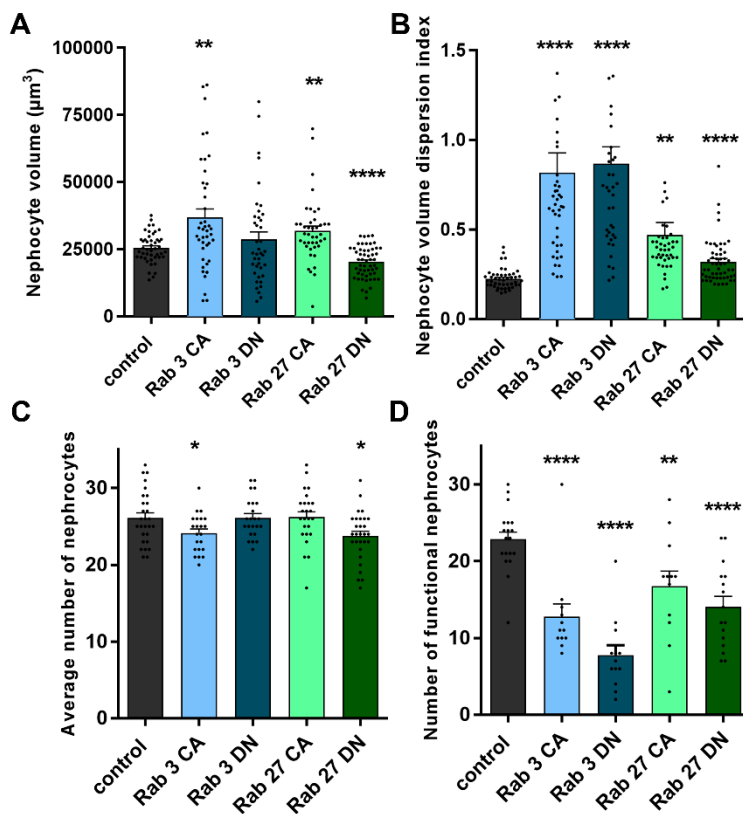


Figura 3.1. Los nefrocitos pericárdicos de *Drosophila* requieren Rab 3 y Rab 27 para mantener el número funcional y el volumen de nefrocitos. Volumen de nefrocitos (μm^3) (A) e índice de dispersión del volumen de nefrocitos (B) de hembras adultas de 1 semana de edad. Número promedio de nefrocitos totales (C) y nefrocitos funcionales (D) de hembras adultas de 1 semana de edad. Prueba estadística *t de Student* ($\alpha=0.05$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Otra de las características para determinar si hay una alteración en el sistema excretor de *Drosophila* es cuantificar el número de nefrocitos. Para ello, se diseccionaron hembras de una semana de edad y se cuantificaron tanto el número medio de nefrocitos totales (Figura 3.1 C) como el número de nefrocitos funcionales (Figura 3.1 D), que se caracterizan por ser células GFP positivas y por poseer una membrana y núcleo no fragmentado. A una semana de edad, observamos que el número total de nefrocitos era menor en aquellas moscas que expresaban la versión CA de Rab 3 y la versión DN de Rab 27 (Figura 3.1 C), en el resto de los genotipos no se vio una pérdida del número de nefrocitos pericárdicos. No obstante, la cuantificación del número de nefrocitos funcionales mostró que tanto las moscas con la versión CA como la DN de ambas Rab presentaron una pérdida del número de nefrocitos funcionales con respecto al control (Figura 3.1 D). Para determinar si la pérdida del número de nefrocitos se debía a un proceso de desdiferenciación realizamos un ensayo de inmunofluorescencia con el marcador de diferenciación específico de nefrocito, *Klf15*, tanto para los constructos de Rab 3 (Figura 3.2), como para los constructos de Rab 27 (Figura 3.3). El ensayo de inmunofluorescencia con el anticuerpo humano anti-Klf15 en nefrocitos que expresaban tanto la isoforma CA como la DN de Rab 3 (Figura 3.2) y de Rab 27 (Figura 3.3), reveló que la señal de Klf15 en estas células era más baja con respecto a las nefrocitos pericárdicos control, a excepción de los nefrocitos con expresión de la isoforma CA de la Rab 27, cuya señal de Klf15 era prácticamente inexistente.

Estos resultados sugieren que los nefrocitos con alteraciones en la función de Rab 3 (CA y DN) y la versión DN de Rab 27 podrían encontrarse en un proceso de desdiferenciación. En el caso de los nefrocitos que expresaron la isoforma Rab 27 CA, el resultado indica que estos nefrocitos están desdiferenciados. Además, el patrón de expresión de la proteína GFP cambió su distribución en la célula, no haciéndose visible señal GFP en el núcleo y con una señal menos intensa y más difusa en el citoplasma comparado con el control. Esto explicaría la pérdida de nefrocitos (Figura 3.1 C y D). También se conoce que niveles reducidos de Klf15 en los podocitos hacen que éstos sean más susceptibles a cualquier estrés o daño, lo que desencadena la pérdida de estas células⁵⁰. Además, esto indica que su función filtradora y endocítica también se encuentra alterada ya que ésta es dependiente de la función del gen *Klf15*⁴⁹.

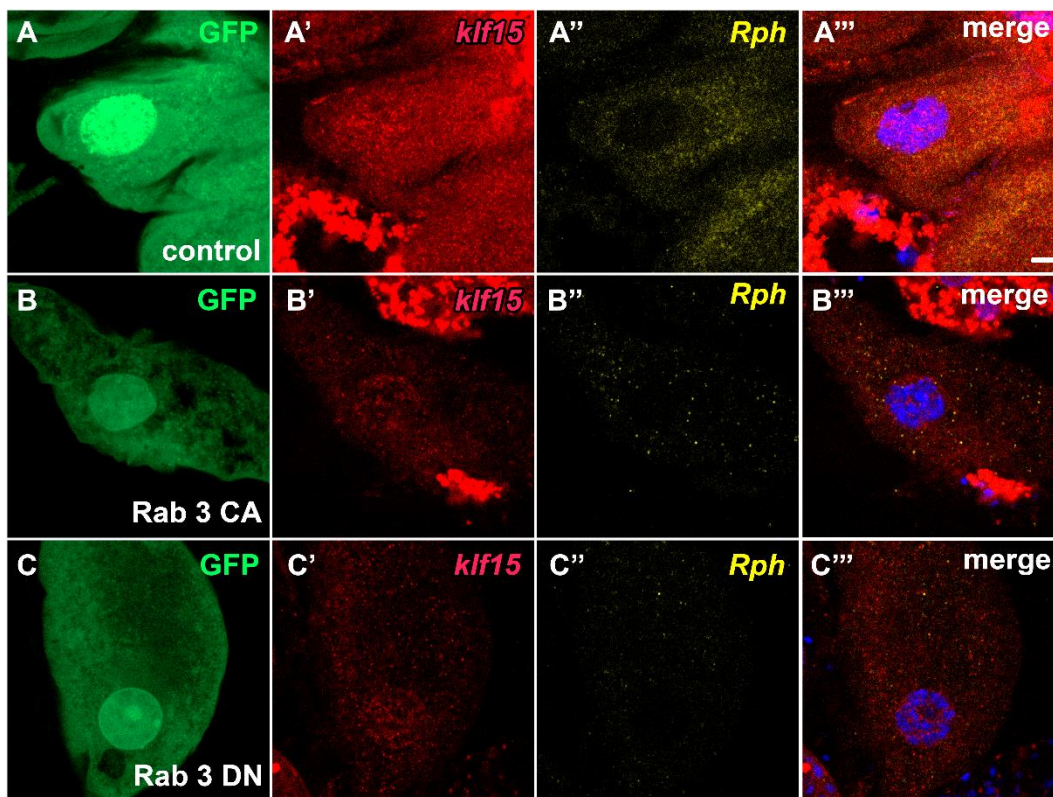


Figura 3.2. Las isoformas CA y DN para Rab 3 mostraron una disminución de la señal del marcador de nefrocitos diferenciados Klf15. La versión Rab 3 DN también presentó disminución de la señal Rph en los nefrocitos pericárdicos. Imágenes confocales de nefrocitos pericárdicos de moscas adultas que expresan el gen reportero GFP (verde en A, B y C) bajo el control del *Hand-Gal4*. La inmunotinción con anticuerpo anti-klf15 (rojo en A', B' y C') mostró una señal más baja en los nefrocitos que expresan la versión CA (B') y DN (C') de Rab 3 en comparación con el control. La inmunotinción con anticuerpo anti-Rph (A'', B'' y C'') reveló una disminución de la señal Rph de nefrocitos pericárdicos que expresan la versión CA y DN de Rab 3 en comparación con el control. Escala = 5 μ m.

Por otra parte, también se realizó un ensayo inmunohistoquímico con el anticuerpo humano anti-Rph, ya que la proteína Rph es un efector tanto de Rab 3 como de Rab 27 y es necesaria para su función (capítulo 1). El ensayo reveló que, la señal de Rph en los nefrocitos Rab 3 CA cambió su distribución, que pasó de una forma difusa y punteada en el control (Figura 3.2 A'') a una forma exclusivamente más punteada con mayor intensidad de señal (Figura 3.2 B''). En cambio, para los nefrocitos que expresaron la isoforma Rab 3 DN, la señal de Rph disminuyó con respecto a los nefrocitos control (Figura 3.2 C). Este resultado indica que Rab 3 sería necesaria para mantener los niveles de Rph adecuados en las células.

Al realizar el mismo ensayo de inmunofluorescencia con el anticuerpo humano anti-Rph en las moscas con expresión de la versión CA de Rab 27, la señal de Rph prácticamente desapareció (Figura 3.3 B’’). No obstante, en las moscas Rab 27 DN, la señal de Rph no mostró cambios en cuanto a la intensidad de la señal, aunque sí se observó un patrón de señal con puntos de mayor tamaño con respecto a las moscas control (Figura 3.3 A’’ y C’’). Este resultado sugiere que la pérdida de la función de Rab 27 no es tan comprometida como la pérdida de función de Rab 3 (isoforma DN). No obstante, la pérdida de señal de Rph en la versión CA de Rab 27 podría explicarse por el estado desdiferenciado del nefrocito.

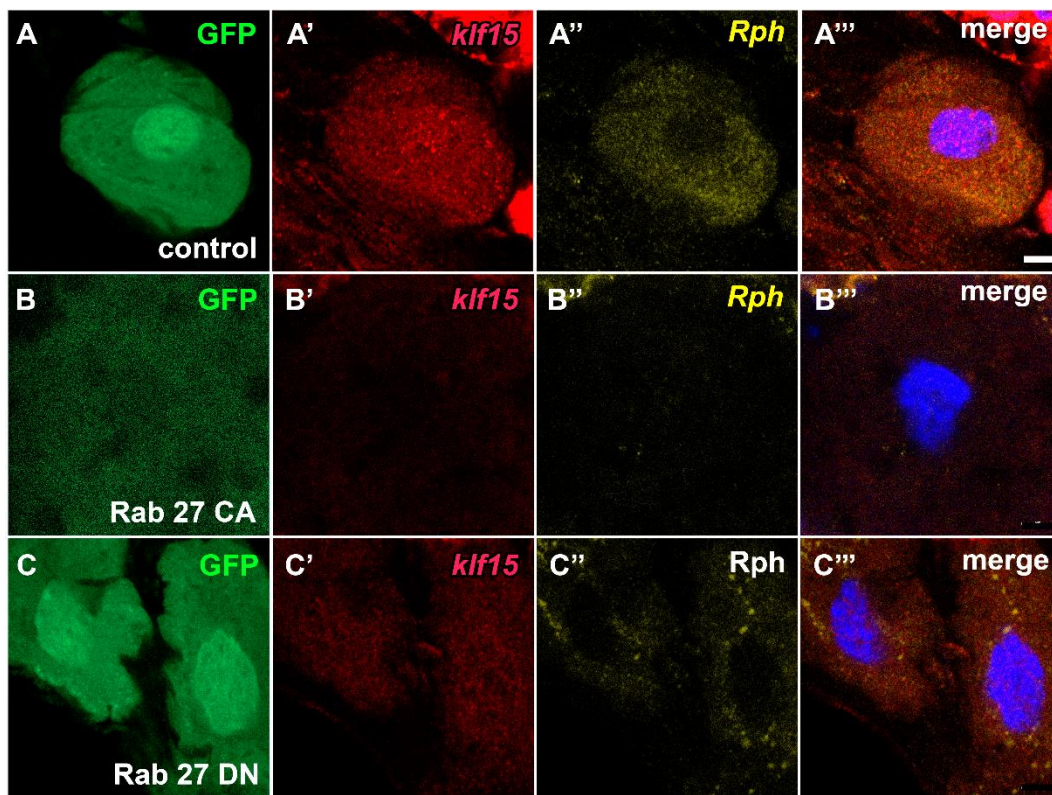


Figura 3.3. Las construcciones CA y DN de Rab 27 provocan una disminución en la intensidad de la señal del marcador de nefrocitos diferenciados, *klf15*, y un cambio en la distribución de la señal de Rph en los nefrocitos pericárdicos. Imágenes confocales de nefrocitos de moscas adultas que expresan el reportero GFP (verde en A, B y C) bajo el control de *Hand-Gal4*. La inmunotinción con anticuerpo anti-*klf15* (rojo en A', B' y C') mostró una señal más baja en los nefrocitos que expresan la versión CA (B') y DN (C'') de Rab 27 que en los nefrocitos control. La inmunotinción con anticuerpo anti-Rph (A'', B'' y C'') reveló cambios en el nivel y la distribución de la señal de Rph en los nefrocitos pericárdicos que expresaban la versión CA y DN de Rab 27, respectivamente, en comparación con el control. Escala = 5 μ m.

3.3.2 La disfunción de las proteínas Rab en los nefrocitos altera el tráfico vesicular y la reabsorción molecular de los nefrocitos pericárdicos.

Otra de las formas para conocer si el nefrocito conserva su función filtradora y endocítica es a través de la ingesta de una toxina, como el nitrato de plata (AgNO_3). Este es endocitado por los nefrocitos si éstos funcionan adecuadamente. En caso de que las células no puedan ejercer su acción filtradora y endocítica, la toxina se va acumulando en la hemolinfa lo que resulta tóxico y se traduce en una disminución de la supervivencia. Para determinar si la alteración de la función de las Rab 3 y Rab 27 tienen un impacto en la endocitosis de esta toxina, se alimentaron larvas L1 y moscas adultas con expresión de las construcciones CA y DN para la Rab 3 y Rab 27 con comida suplementada con 0.01% de AgNO_3 (Figura 3.4 A). Se cuantificó el número de larvas que llegaron a estado de pupa y se observó que las larvas con expresión CA de Rab 3 presentaron un porcentaje de pupación significativamente mayor que las moscas control (Figura 3.4 A). No obstante, el resto de los genotipos no mostraron cambios (Figura 3.4 A). Se analizaron las curvas de supervivencia de los adultos alimentados con AgNO_3 y se observó que las construcciones DN de Rab 3 y Rab 27 mostraron una significativa reducción de la vida media con respecto al control. Además, todos los genotipos mostraron una vida máxima significativamente reducida con respecto al control (Figura 3.4 B). Estos resultados sugieren que la función de Rab 3 en la detoxificación de compuestos parece ser más crítica que la de Rab 27. Además, la activación constitutiva de Rab 3 parece ser beneficiosa para la detoxificación de AgNO_3 en estadio de larva, mientras que la versión DN de Rab 3 parece ser perjudicial para la detoxificación en adultos.

Las moléculas presentes en la hemolinfa pueden ser endocitadas a través de la membrana basal del nefrocito o filtradas a través de la hendidura de filtración (ND) para su posterior reabsorción o endocitosis en la parte más profunda del canal laberíntico por parte del sistema Cubilin-Amnionless. Estos procesos de captación de moléculas son dependientes del tamaño. Así, las moléculas más grandes son captadas mediante endocitosis mientras que las más pequeñas pasan a través de los ND; las moléculas intermedias podrían pasar a través de ambos procesos. Para conocer si ambos procesos se encuentran alterados en los nefrocitos *in vivo*, se utilizaron una serie de moléculas de dextrano marcadas con un fluoróforo de distinto tamaño, mientras que las moléculas de dextrano de 10-kD atraviesan los ND, las moléculas de 70-kD pueden entrar mediante endocitosis directa o a través del complejo Cubilin-Amnionless.

Disecionamos los abdómenes de hembras de una semana de edad y los incubamos con dextrano de 10- y 70-kD para observar la función de los nefrocitos. Observamos que el dextrano de menor tamaño era principalmente captado por las isoformas de Rab 3, mientras que la isoforma DN de Rab 27 lo captó de una forma deficiente con respecto al control (Figura 3.4 M). En cambio, con el dextrano de mayor peso molecular (70-kD), los nefrocitos Rab 3 DN y Rab 3 CA no pudieron retenerlo (Figura 3.4 N). Estos resultados sugieren que Rab 3 es necesaria para realizar correctamente la endocitosis. Además, también parece ser importante para la formación de los ND ya que las partículas más pequeñas (10-kD) son filtradas con mayor facilidad que en el caso de los nefrocitos control. En el caso de Rab 27, los resultados sugieren que ésta no tendría un papel tan relevante en la endocitosis. Sin embargo, sí tendría un papel importante en la filtración a través de los ND ya que las moléculas de dextrano de 10-kD no son captadas tan eficientemente como en el caso control (Figura 3.4 C-N).

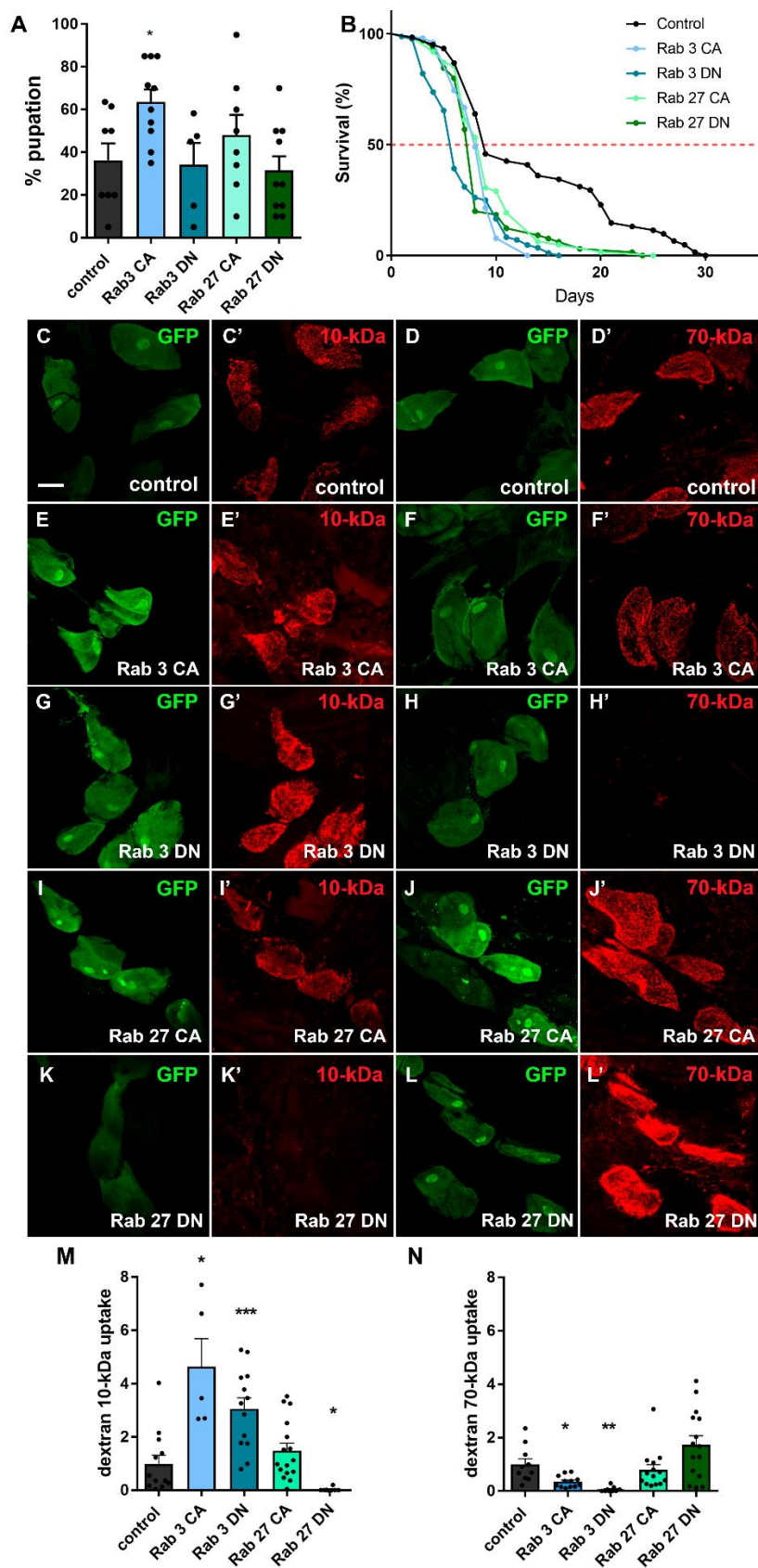


Figura 3.4. Rab 3 y Rab 27 son necesarios para la filtración y la endocitosis en nefrocitos. A. Porcentaje de larvas L1 con CA y DN para la Rab 3 y 27 que llegaron a estadio de pupa con comida suplementada con 0.01 % de AgNO_3 . B. Curvas de supervivencia de machos adultos que expresan las versiones CA y DN de la Rab 3 y Rab 27, alimentados con comida suplementada con 0.01 % de AgNO_3 . C-N. Ensayo de captación de dextrano fluorescente. C-L'. Imágenes confocales de nefrocitos controles (*Hand-Gal4 > UAS-GFP* en C y C' y D y D') y nefrocitos que expresan las versiones CA y DN de Rab 3 y Rab 27 incubados con dextrano de 10-kD (rojo en C, C', E, E', G, G', I, I', K y K') y 70-kD (rojo en D, D', F, F', H, H', J, J', L y L'). M y N. Cuantificación de la captación de dextrano 10-kD (M) y 70-kD (N). Escala = 20 μm . Prueba estadística *t de Student* ($\alpha = 0.05$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

3.3.3 Las proteínas Rab son necesarias para la integridad de los ND y los canales laberínticos de los nefrocitos pericárdicos de *Drosophila*.

Para determinar si la alteración de la función de las proteínas Rab tenía un impacto en las estructuras subcelulares típicas o específicas de los nefrocitos, analizamos mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), la membrana basal, los canales laberínticos y los ND. El número de ND por μm no cambió significativamente en ninguno de los genotipos (Figura 3.5). No obstante, los nefrocitos que expresaban la versión DN de Rab 3 presentaron NDs desorganizados, sin la forma que los caracteriza (Figura 3.5 y Figura Anexo 3.1). Además, en algunas de las zonas había un número significativamente mayor de NDs (Figura Anexo 3.1), mientras que en otras zonas había ausencia o un número muy reducido de hendiduras (Figura Anexo 3.1). No se pudo determinar el tamaño de los poros de los nefrocitos Rab 3 DN debido al alto grado de desorganización (Figura 3.5). No obstante, las imágenes sugieren que el tamaño podría ser significativamente menor con respecto a los controles (Figura 3.5 y Figura Anexo 3.1). Asimismo, la membrana basal estaba ausente en estos nefrocitos Rab 3 DN (Figura 3.5 y Figura Anexo 3.1). Los nefrocitos Rab 27 CA y Rab 27 DN mostraron un tamaño de hendidura de filtración significativamente mayor con respecto a los controles. Sin embargo, los NDs de los nefrocitos Rab 3 CA presentaron un tamaño de poro significativamente menor (Figura 3.5). Estos resultados indican que la perturbación de la actividad normal de las proteínas Rab 3 y Rab 27 tienen un impacto en la formación o establecimiento de la hendidura de filtración de los nefrocitos.

Encontramos que los canales laberínticos estaban ausentes en los nefrocitos Rab 3 DN (Figura 3.5). En los nefrocitos que expresaron la versión CA para Rab 3 y Rab 27, y DN para Rab 27, los canales eran de tamaño menor o estaban ausentes con respecto al control (Figura 3.5). También se cuantificó el número de endosomas y lisosomas para determinar posibles alteraciones en la ruta endocítica y en el procesamiento de las moléculas captadas por los nefrocitos pericárdicos. El número de endosomas fue significativamente menor para los genotipos con activación constitutiva pero no para los que expresaban la versión dominante negativa de las Rabs. Curiosamente, en los nefrocitos Rab 3 DN se observó un mayor número de endosomas sin carga internalizado comparado con los nefrocitos control (Figura Anexo 3.1). En el número de lisosomas no se observó ningún cambio en las moscas Rab 27 CA y Rab 27 DN, aunque sí se observó una reducción y una tendencia decreciente en las moscas Rab 3 CA y Rab 3 DN, respectivamente (Figura 3.5). Estos resultados sugieren que la

ruta endocítica y de procesamiento de moléculas se encuentra alterada cuando hay una desregulación de la actividad de la proteína Rab 3 en el nefrocito.

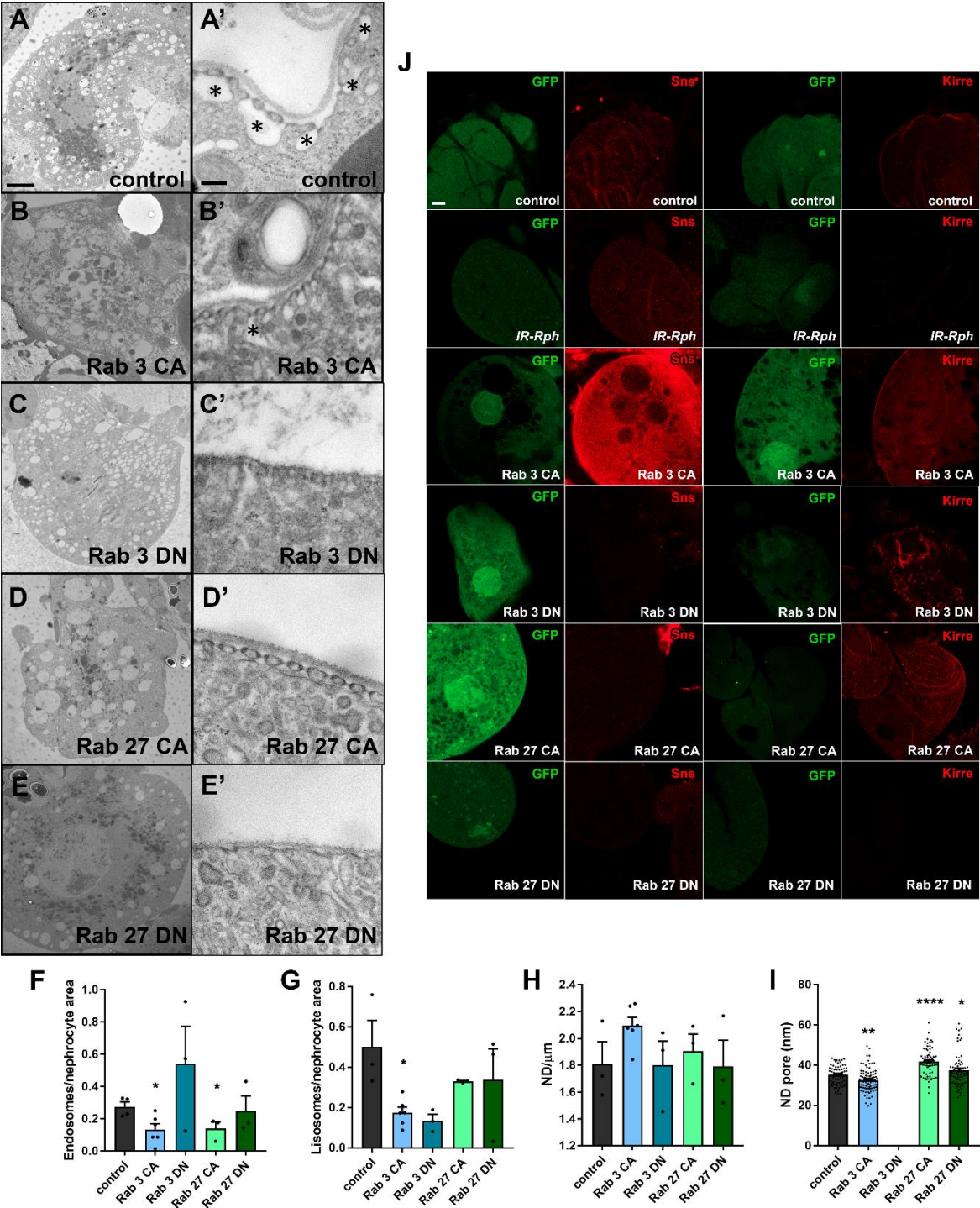


Figura 3.5. Rab 3 y Rab 27 son esenciales para mantener las estructuras de los NDs y los canales laberínticos de los nefrocitos. En comparación con las moscas control (A y A') y las moscas Rab 3 CA (B y B'), los nefrocitos Rab 3 DN (C y C'), Rab 27 CA (D y D') y Rab 27 DN (E y E') no tenían canales laberínticos o estaban reducidos (asterisco, *). Además, los nefrocitos Rab 3 DN mostraron unos ND desorganizados y ausencia de membrana (C'). F. Número de endosomas. G. Número de lisosomas. H. Número de NDs/ μm . I. Tamaño del poro. Escala, 4 μm en A-E; 200 nm en A-E'. Test estadístico *t de Student* de dos colas ($\alpha = 0.05$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. J. Ensayo inmunohistoquímico contra las proteínas Sns y Kirre en nefrocitos control, *IR-Rph*, Rab 3 CA, Rab 3 DN, Rab 27 CA y Rab 27 DN. Escala = 10 μm .

Los ensayos inmunohistoquímicos contra las proteínas Sns y Kirre revelaron cambios en la intensidad y la distribución de la señal de estas proteínas. La intensidad de la señal de la proteína Sns se redujo en todos los genotipos excepto en los nefrocitos Rab 3 CA, en los que se ve claramente una mayor intensidad con respecto al control (Figura 3.5 J). El ensayo inmunohistoquímico con el anticuerpo anti-Kirre mostró cambios en la distribución de la señal de la proteína en el caso de los nefrocitos Rab 3 DN, cuya señal pasó de ser difusa y homogénea, en los nefrocitos control, a ser punteada e irregular (Figura 3.5 J). Además, la señal de Kirre se vio aumentada en los nefrocitos con activación constitutiva de ambas proteínas Rab, pero fue significativamente menor en el caso de los nefrocitos con interferencia de la expresión de *Rph* (*IR-Rph*) y los nefrocitos Rab 27 DN (Figura 3.5 J).

Estos resultados indican que las proteínas Rab podrían estar implicadas en la formación y el mantenimiento de la hendidura de filtración del nefrocito. Los datos sugieren que la activación constitutiva de Rab 3 tiene un efecto positivo en cuanto a la cantidad de proteínas Sns y Kirre, lo cual se reflejaría en la tendencia creciente del número de NDs por μm (Figura 3.5 H). Además, la disminución o alteración de la señal de Sns y Kirre en el resto de genotipos explicarían la desorganización de los NDs vistos en las imágenes de microscopía electrónica (Figura 3.5 C' y E').

3.3.4 El papel de las proteínas Rab en un modelo de nefropatía diabética en *Drosophila*.

La diabetes es uno de los principales factores de riesgo para la aparición de la ERC. Aproximadamente, el 40 % de los pacientes con diabetes desarrollan alguna enfermedad renal durante su vida. Factores genéticos y ambientales determinan la susceptibilidad a desarrollar una nefropatía diabética^{154,202}. Es por ello que es necesario identificar mecanismos de inicio y de progresión de la enfermedad con el fin de hallar un tratamiento efectivo que pueda enlentecer o

revertir la nefropatía diabética. Se ha utilizado la mosca como modelo de nefropatía diabética, en el que se ha observado, al igual que en humanos, determinados fenotipos diabéticos como aparición de hiperlipidemia, resistencia a la insulina, cardiomiopatías y, concretamente, una pérdida en la formación de la hendidura de filtración con la consecuente pérdida de funcionalidad¹⁰⁰.

Se conoce que las pequeñas proteínas Rab GTPasas están involucradas en la nefropatía diabética. Las proteínas Rab 34 y Rab 38 están implicadas en la regulación de la membrana extracelular del glomérulo y en el aumento de excreción urinaria de albúmina en la nefropatía diabética, respectivamente^{166,203}.

Para dilucidar la implicación de las proteínas GTPasas Rab 3 y Rab 27 y su efector Rph en un modelo de nefropatía diabética, llevamos a cabo experimentos de supervivencia con larvas y moscas diabéticas que expresaban las versiones CA y DN para estas Rab y moscas *knockdown* para *Rabphilin*. Para el análisis de la supervivencia en estado larvario, cuantificamos el número de larvas L1 que llegaron a pupa (% de pupación). Observamos que el % de pupación de larvas *IR-Rph* y de Rab 3 DN, sembradas en un medio con una concentración 1 M de sacarosa, fue significativamente menor que las larvas control sembradas en el mismo medio (Figura 3.6 A); no hubo ningún efecto en el resto de genotipos (Figura 3.6 A). El análisis de las curvas de supervivencia de los adultos diabéticos reveló una vida media y una vida máxima reducida con respecto a las moscas control; sobre todo en las moscas *IR-Rph*. Sin embargo, las moscas que expresaron la CA de Rab 3 presentaron una vida media total mayor que las moscas control (Figura 3.6 B). Estos resultados indican que, en condiciones de estrés por hiperglucemia, cambios en la actividad de las Rab y la interferencia de *Rph* en los nefrocitos empeoran la funcionalidad de estas células provocando mayor toxicidad por azúcar, traducándose en mayor mortalidad. Sin embargo, curiosamente Rab 3 CA parece que tiene una tendencia a mejorar cierto grado de la toxicidad por hiperglucemia.

Para determinar el nivel de captación de glucosa de los distintos genotipos, incubamos los nefrocitos con 2-NBDG, un análogo fluorescente de la glucosa (Figura 3.6 C). Los resultados mostraron que, al igual que las gráficas de supervivencia, las moscas con expresión de *Rab 3 DN*, *Rab 27 CA* e *IR-Rph*, retuvieron significativamente menor cantidad de 2-NBDG, mientras que las moscas Rab 3 CA presentaron una tendencia, aunque no significativa, a captarla más (Figura 3.6 C).

Estos resultados sugieren que las moscas *Rab 3 DN* e *IR-Rph*, al captar menor cantidad del análogo de glucosa (Figura 3.6 C), ésta permanece circulando en la hemolinfa, lo que resulta tóxico para el organismo y se traduce en un menor porcentaje de pupación y una mayor mortalidad en adultos (Figura 3.6 A y B).

Con el fin de identificar cambios en el nivel de la expresión de la *Rab 3*, *Rab 27* y *Rph* en los nefrocitos de las moscas diabéticas, realizamos un análisis de RT-qPCR. La expresión del gen *Rph* no se pudo determinar mediante este ensayo. No obstante, observamos que, aunque no hubo cambios en la expresión de *Rab 27* (Figura 3.6 E), la expresión de *Rab 3* fue 4 veces superior en los nefrocitos de moscas diabéticas comparado con los de las moscas control (Figura 3.6 D). Realizamos un ensayo de inmunofluorescencia contra las proteínas Rab 3, Rab 27 y Rph para determinar cambios en el patrón de expresión de éstas. No se observaron cambios en la señal de Rab 27 entre los nefrocitos de moscas diabéticas y moscas control (Figura 3.6 H-I''' y 3.6 L). En cambio, la señal de Rab 3 y Rph se vio afectada. El patrón de señal de Rab 3 cambió, pasó a ser una señal más punteada y difusa (Figura 3.6 F' y G'), aunque los niveles de la señal no cambiaron (Figura 3.6 J). La señal de Rph disminuyó significativamente en los nefrocitos de las moscas diabéticas en comparación con los controles (Figura 3.6 F'', G'', H'', I'' y K).

Nuestros resultados sugieren que tanto Rab 3 como su efector Rph podrían tener un papel relevante en la aparición y progresión de la nefropatía diabética ya que la disminución de la actividad o la función de éstos tiene un impacto directo en la filtración y/o reabsorción de la glucosa.

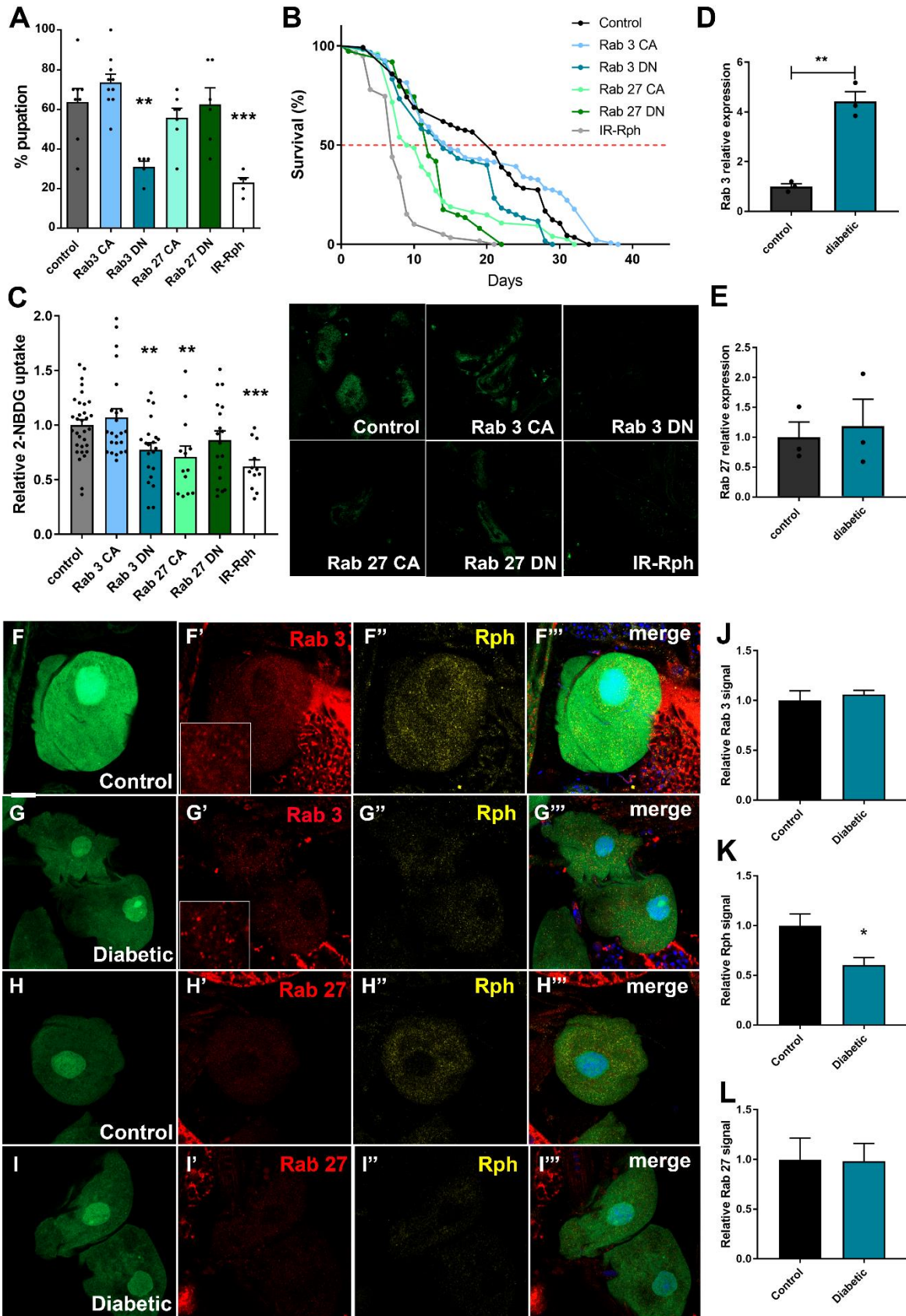


Figura 3.6. Los niveles de expresión de *Rab 3* y de proteína de *Rph* se encuentran alterados en el modelo de nefropatía diabética de *Drosophila*. A. Porcentaje de larvas L1, con expresión CA y DN para la *Rab 3* y *27* e *IR-Rph*, que llegaron a pupa (% pupation) bajo condiciones de hiperglucemia. B. Curvas de supervivencia de machos adultos que expresan las versiones CA y DN de la *Rab 3* y *27* e *IR-Rph*, alimentados con comida suplementada con 1 M de sacarosa. C. Cuantificación e imágenes confocales de la captación de 2-NBDG (verde) de nefrocitos CA, DN de *Rab 3* y *Rab 27*, *IR-Rph* y control. D y E. RT-qPCR para cuantificar los niveles de expresión de *Rab 3* y *Rab 27* en nefrocitos control y diabéticos, en relación con los controles endógenos. F-I'''. Imágenes de microscopía confocal de nefrocitos control (F-F''' y H-H''') y nefrocitos diabéticos (G-G''' y I-I'''). La inmunotinción mostró un cambio en el patrón de señal de *Rab 3* (en rojo en G') y una disminución de la señal de *Rph* (en amarillo en G'' e I'') en los nefrocitos de moscas diabéticas, pero no se observaron cambios en la señal de *Rab 27* (en rojo en H' e I'). J-L. Cuantificación de la inmunotinción de la señal de *Rab 3*, *Rab 27* y *Rph*. Escala = 10 μ m. Prueba estadística *t* de *Student* de dos colas ($\alpha = 0.05$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.4 Discusión

Las proteínas Rab, proteínas involucradas en regular, coordinar y organizar el tráfico vesicular en diversos tipos celulares podrían estar implicadas en el mantenimiento e integridad de los nefrocitos y los podocitos. Así pues, se ha visto que algunas proteínas Rab como son la *Rab 8*, *Rab 5*, *Rab 34* y *Rab 38* son esenciales para el funcionamiento de los podocitos. En este trabajo, nos proponemos determinar el papel de las proteínas *Rab 3*, *Rab 27* y su efector *Rabphilin* en un modelo de daño renal en *Drosophila*. En el presente estudio mostramos que *Rab 3* y *Rab 27* tienen una función relevante en la filtración, endocitosis y en el mantenimiento del estado diferenciado de los nefrocitos.

Una alteración en el transporte vesicular de las células conlleva a la desorganización del citoesqueleto de éstas y a la consecuente pérdida de función. Alteraciones en la actividad de las proteínas Rabs en los nefrocitos tuvieron un impacto en el citoesqueleto, tal y como se muestra en la Figura 3.1 y la Figura 3.5, donde hay una variación en el volumen del nefrocito y una reducción del tamaño de los canales laberínticos, respectivamente. Además, esta alteración de su morfología también es indicativo de un estado no diferenciado de estas células, lo cual se observa en las Figuras 3.2 y 3.3.

Estudios anteriores indican que al menos el complejo *Rabphilin-Rab3* estaría implicado en la endocitosis (Capítulo 1). Las imágenes TEM mostraron en los nefrocitos *Rab 3* DN, NDs desorganizados y con un tamaño de poro aparentemente menor que los controles (no medible por

la falta de estructura), además de la completa ausencia de los canales laberínticos, esto podría explicar la mayor captación de moléculas pequeñas (de 10-kD) y la menor captación de las grandes (70-kD) (Figura 3.4). Los nefrocitos Rab 3 CA que presentaron cambios estructurales como tamaño de la hendidura de filtración más pequeño, tuvieron menor mortalidad larvaria (mayor porcentaje de pupación, Figura 3.4 A) y mayor vida máxima que las moscas control (Figura 3.6 B) en presencia de toxinas. Esto se correlaciona con la mayor tasa de captación de dextrano de 10-kD, lo que indicaría y confirmaría la importancia de la Rab 3 en la endocitosis de moléculas en los nefrocitos. No obstante, el número de endosomas fue significativamente menor con respecto al control, por lo que se esperaría que la ruta endocítica fuera menos activa. Además, el ensayo inmunohistoquímico de los nefrocitos de las moscas Rab 3 CA mostró que la señal de Sns y Kirre era mayor en estas células que en las moscas control, por lo que Rab 3 también podría estar implicada en la formación de los NDs o al menos en el transporte y la localización de Sns. Esto explicaría porqué los nefrocitos Rab 3 DN tienen los NDs desorganizados. Estos resultados sugieren que Rab 3 no sólo mediaría en la endocitosis de moléculas, sino que también tendría un papel en la filtración a través de los NDs sin la necesidad de internalizar determinados cargos en vesículas.

Asimismo, las moscas Rab 3 DN, muestran un nivel de captación de 2-NBDG menor que las moscas control, lo que se traduce en mayor mortalidad a causa de hiperglucemia. Además, en las moscas diabéticas se observó un aumento de hasta 4 veces la expresión del gen *Rab 3*, similar a lo que se ha descrito en enfermedades renales con proteinuria, en el que hay más proteína Rab 3¹¹⁰.

Se ha descrito que la composición de la membrana basal del glomérulo también se ve afectada en la nefropatía diabética²⁰⁴ y que las proteínas Rab GTPasas, podrían desempeñar un papel fundamental en la modulación de la regulación y expresión de la composición de la membrana extracelular en la nefropatía diabética²⁰⁴. En las imágenes de TEM de este trabajo, la membrana basal formada y organizada por las proteínas del ND, Sns y Kirre, estaba ausente en gran parte de los nefrocitos Rab 3 DN y Rab 27 DN. Estos mismos nefrocitos, en los ensayos inmunohistoquímicos, no mostraron señal de Sns, y la señal de Kirre estaba deslocalizada en el caso de Rab 3 DN y ausente en los nefrocitos Rab 27 DN. Según estos datos, Rab 3 y Rab 27 tendrían un papel en la organización de los NDs. La alteración de estos NDs explicaría la ausencia o perturbación de la membrana basal de los nefrocitos.

En este sentido, según nuestros resultados, la sobreexpresión de Rab 3 conduciría a un aumento del nivel de Sns y Kirre en los NDs (Figura 3.5 J) que contribuiría a la alteración de la composición de la membrana basal y por lo tanto favorecería la aparición de proteinuria. No obstante, en una etapa

inicial y de breve duración, la mayor actividad de Sns podría ser beneficioso (para una detoxificación puntual y rápida) ya que, según nuestros resultados, los nefrocitos Rab 3 CA muestran una tendencia a desarrollar mayor número de NDs (con un tamaño menor) (Figura 3.5).

La sobreexpresión de *Rab 3* descrita en nuestro modelo de nefropatía diabética, sugiere que Rab 3 estaría implicada en el desarrollo y/o progresión de la nefropatía diabética. Esta Rab no sería la única involucrada en esto ya que Goldenberg et al. 2009²⁰³ describió que la proteína Rab 34, implicada en el transporte vesicular en podocitos²⁰⁵ y su efector munc13-2, sobre-expresada en pacientes con diabetes, promueven la secreción de fibronectina por parte del podocito en un ambiente con elevada concentración de glucosa²⁰³. Además, otra Rab que podría estar implicada es la Rab38. La expresión de Rab 38 se encuentra incrementada en el túbulo y glomérulos de pacientes con nefropatía diabética. Estos resultados demuestran que las proteínas Rab están involucradas en la patogénesis de la nefropatía diabética. Al igual que el incremento en la expresión de Rab 38 en el trabajo de Teumer A et al. 2016¹⁶⁶, el aumento de la expresión del transcrito de Rab 3 en nuestro modelo diabético podría indicar una adaptación de la maquinaria del nefrocito para la reabsorción de moléculas y proteínas. Esto también viene apoyado por trabajos anteriores en los que se describe un aumento de la expresión de *Rab 3* en enfermedades proteinúricas¹¹⁰.

Aunque los cambios en la actividad de Rab 27 sobre los nefrocitos no son tan robustos como los provocados por Rab 3; Rab 27 también tiene un papel importante en éstos. Los nefrocitos Rab 27 DN presentaron tamaños de poro más grandes (aunque algunos de ellos estaban desorganizados) y ausencia de canales laberínticos con respecto a los nefrocitos control, aunque esta particularidad no tuvo consecuencias en los niveles de captación de AgNO₃ en las larvas ni de 2-NBDG, los niveles de dextrano de 10-kD retenidos fueron significativamente menores comparado con los controles. Curiosamente, Rab 27 CA captó menos cantidad de 2-NBDG. Las moscas Rab 3 DN, también retuvieron menor cantidad del análogo de la glucosa, lo que sugiere que Rab 3 y Rab 27 actuarían como antagonicos en el procesado de esta molécula. Esto podría deberse a una competición por la unión de su mismo efector, la Rph.

Nuestros datos muestran que Rab 3 y Rab 27 tendrían papeles clave en el mantenimiento de los NDs y de los canales laberínticos, por lo que serían determinantes para las funciones de filtración, endocitosis y tráfico vesicular del nefrocito. Así, una descompensación de la actividad de estas Rab provocaría una pérdida de la identidad del nefrocito lo que desencadenaría en falta de actividad de detoxificación. Además, nuestros resultados indican que Rab 3 y su efector Rph estarían implicados en la aparición y/o desarrollo de la nefropatía diabética, pues cuando ésta aparece los niveles de

ambas proteínas se ven alterados. Esto abre una vía para el estudio de estas proteínas como posibles marcadores o dianas terapéuticas en la aparición de la enfermedad.

CAPÍTULO 4

El silenciamiento de *Rabphilin* sensibiliza a estrés hiperglucémico: caracterización del modelo en *Drosophila* y rastreo de fármacos.

CAPÍTULO 4

El silenciamiento de *Rabphilin* sensibiliza a estrés hiperglucémico: caracterización del modelo en *Drosophila* y rastreo de fármacos.

4.1 Introducción

El 40 % de los pacientes diabéticos desarrollan una patología renal causada por la presencia de hiperglucemia^{142,143}. En la actualidad, un 8-10 % de la población mundial presenta diabetes¹⁴⁴, lo que supone un gran número de personas en riesgo a padecer nefropatía diabética. Aun así, todavía se desconocen muchos aspectos y mecanismos de la aparición y desarrollo de la enfermedad y encontrar un tratamiento que pueda parar y revertirla supone un gran reto. Es por ello que todavía es necesario identificar variantes genéticas y factores que desencadenan la nefropatía diabética.

Drosophila melanogaster posee un sistema de excreción cuyas células principales son los nefrocitos³⁸. Estos nefrocitos son los responsables de la filtración y reabsorción de moléculas presentes en la hemolinfa y comparte gran similitud estructural, funcional y molecular con los podocitos humanos y las células del túbulo proximal^{63,206}. Esta gran homología entre las células junto a la alta conservación de genes asociados con enfermedades renales convierte a *Drosophila* en un modelo válido y con gran potencial para la realización de cribados genéticos y farmacológicos en esta enfermedad^{5,39,168}.

La administración de una dieta con altas concentraciones de azúcar (1 M), permite conseguir un modelo de mosca con fenotipos diabéticos que incluyen hiperglucemia, hiperlipidemia, resistencia a insulina y cardiopatía diabética¹⁰⁰. En este modelo de nefropatía diabética, al igual que ocurre en humanos, se produce una infraexpresión de los genes que codifican para las proteínas que forman la hendidura de filtración, concretamente *Sns*, con lo que conlleva a una pérdida de la función de filtrado. La mosca ya ha sido empleada para el estudio y búsqueda de posibles dianas terapéuticas de enfermedades renales²⁰⁰ y otras patologías²⁰⁷.

En los capítulos anteriores, determinamos la implicación del complejo *Rab-Rabphilin* en el sistema excretor de *Drosophila* y el impacto de un ambiente hiperglucémico sobre este mismo complejo y sistema. En este trabajo, nos proponemos identificar compuestos reposicionables, procedentes de la quimioteca comercial Prestwick, y aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) con actividad contra el daño renal producido por la interferencia de la expresión de *Rph* y por la hiperglucemia.

4.2 Material y Métodos

4.2.1. Líneas de *Drosophila*

Las líneas *UAS-IR-Rph* (número BDSC: 25950), *UAS-IR-bcd*, *UAS-luciferase (UAS-luc)* y *Sco/Cyo-GFP* (número BDSC: 9352) se obtuvieron de *Bloomington Drosophila Stock Center* (Universidad de Indiana). La línea *Sns-Gal4* se obtuvo del laboratorio de la Dra. M Ruiz-Gómez (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC y UAM). La línea recombinante *Sns-Gal4 UAS-luc* se generó en este trabajo. Todos los cruces se mantuvieron a 25 °C en medio nutritivo estándar.

4.2.2. Preparación de medio de cultivo con fármacos

Se añadieron 2 µl de compuesto, disuelto con 10% de DMSO, a 200 µl de medio nutritivo estándar suplementado con 1 M de sacarosa y se distribuyeron en placas de 96 pocillos. Como control del compuesto se agregaron 2 µl de DMSO al 10% a 200 µl de medio nutritivo estándar suplementado con 1 M de sacarosa. Los compuestos testados procedían de la quimioteca Prestwick, en total se testaron 1200 fármacos (15 placas de 96 pocillos con 80 compuestos por placa) por triplicado a una concentración final de 1 µM. Los pocillos de las columnas 2-11 contenían el medio nutritivo con compuesto (Figura 4.3 A); las columnas 1 y 12 contenían el medio sin compuesto, sólo con DMSO (Figura 4.3 A).

4.2.3. Siembra de embriones con *COPASTM FP Flow Cytometer*

Machos con el constructo *UAS-IR-Rph* se cruzaron con hembras vírgenes *Sns-Gal4 UAS-luc* en sistemas de puesta con placas de agar para la obtención de embriones. Las placas de agar, con medio fresco, de los sistemas de puesta se cambiaron cada 2 días. Con este cambio se añadieron periódicamente nuevos parentales. Tras 24 horas, los embriones se recogieron para la siembra mediante el equipo *COPASTM Flow Cytometer* (Union Biometrica). Con este equipo, se sembraron 6 larvas L1, con genotipo *Sns-Gal4 UAS-luc>IR-Rph*, en los 96 pocillos de las placas.

4.2.4. Ensayo de luminiscencia

Grupos formados por 1, 2 y 3 adultos (machos o hembras, por separado) de 3 días de edad, se homogenizaron con 200 µl de tampón *Cell Culture Lysis Reagent*, CCL 1X (kit E1500, Promega). Seguidamente, se transfirieron 50 µl de cada homogenizado por triplicado (en total 150 µl de cada homogenizado) a nuevas placas de 96 pocillos y se agregaron 20 µl de luciferina en cada pocillo (kit

E1500, Promega). Finalmente, la luminiscencia de cada pocillo se cuantificó mediante un lector de microplacas (Infinite M200 Pro, TECAN).

4.2.5 Análisis estadístico

Por cada placa de 96 pocillos se analizaron 80 compuestos pertenecientes a una placa de la quimioteca Prestwick. Los homogenizados procedentes de 1, 2 y 3 moscas tratadas con compuestos se compararon con sus correspondientes controles de 1, 2 y 3 individuos alimentados con comida estándar sin suplemento de fármaco. El análisis se realizó con tres réplicas técnicas de tres réplicas biológicas. El test estadístico que se utilizó fue *t de Student* no pareado con dos colas ($\alpha = 0.05$). Se aplicó el test de corrección *Welch* cuando fue necesario.

4.3 Resultados

4.3.1 Generación de la línea recombinante *Sns-Gal4>UAS-IR-Rph:luc*

Anteriormente (capítulo 1), describimos que la interferencia de la expresión de *Rph* conlleva a la disminución de la expresión del gen *Sns*, que es imprescindible para la función de filtración del nefrocito. Por otra parte, en un estudio anterior también se describió que concentraciones elevadas de azúcar (sacarosa) en la hemolinfa conlleva a una infraexpresión del gen *Sns*¹⁰⁰. Para cuantificar indirectamente, de una forma sencilla y rápida la expresión de *Sns*, generamos una línea de *Drosophila* que presentaba el reportero luciferasa aguas abajo del promotor de *Sns*, es decir, la línea llevaba el constructo *Sns-Gal4* y el constructo *UAS-luc* (Figura 4.1 A). Además, estas moscas se cruzaron con una línea *UAS-IR-Rph* (Figura 4.1 B) para interferir la expresión del gen *Rph*. De esta manera obtuvimos una F1 que nos permitió elucidar el efecto conjunto de la interferencia de la expresión de *Rph* y la diabetes sobre el nefrocito.

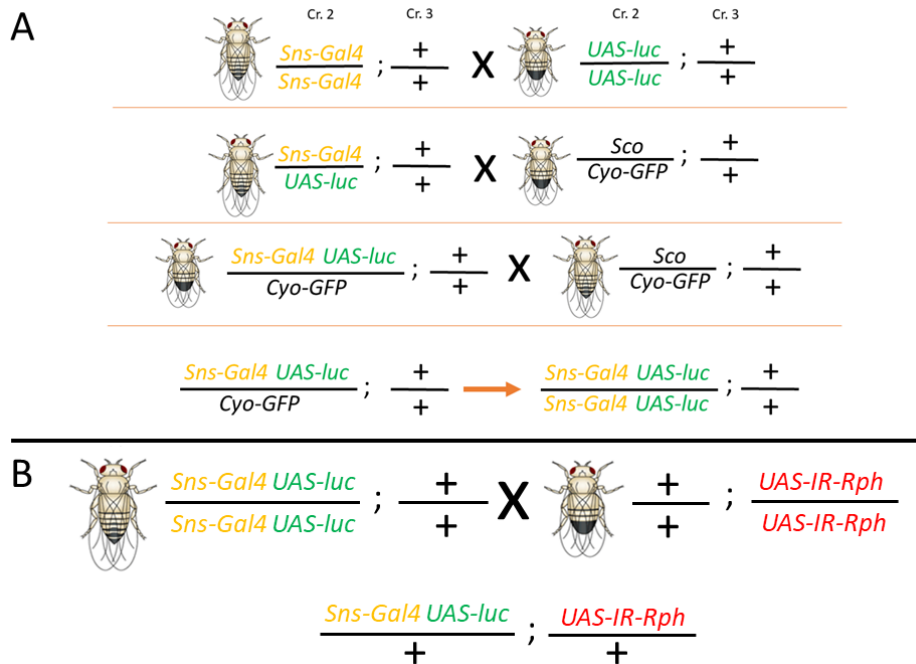


Figura 4.1. Esquema de la generación de las moscas *Sns-Gal4 UAS-luc > UAS-IR-Rph*. Las hembras de cada genotipo y cruces eran hembras vírgenes. + representa un cromosoma salvaje. *Sco* representa *Scutoid*, el alelo del gen *Snail*, *Cyo* es un balanceador del cromosoma 2 con fenotipo de alas curvas. *Sns-Gal4* y *UAS-luc* se encuentran en el cromosoma 2 y el constructo *UAS-IR-Rph* en el cromosoma 3.

Al igual que en el capítulo 1 pero esta vez con las moscas de genotipo *Sns-Gal4 UAS-luc > UAS-IR-Rph*, determinamos que la expresión de *Sns* se vio reducida en las moscas *IR-Rph*, alimentadas con medio nutritivo estándar, ya que los niveles de lectura de luminiscencia eran más bajos en estas moscas comparado con las moscas control (Figura 4.2 A y B). En esta ocasión, describimos que las mismas moscas con 3 días de edad, pero alimentadas con 1 M de sacarosa mostraron niveles aún más bajos de luminiscencia (Figura 4.2 C y D), lo que indica que la expresión de *Sns* se vio más comprometida. Estos resultados nos ofrecen una ventana más grande para la búsqueda de compuestos.

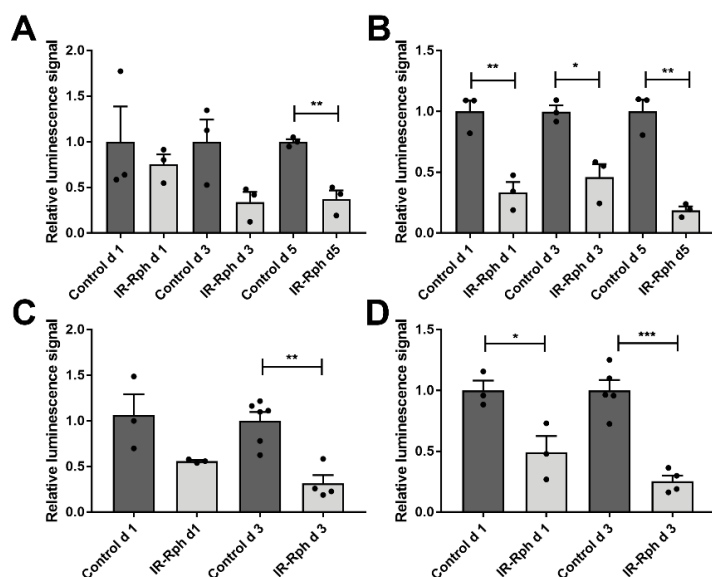


Figura 4.2. Niveles relativos de luminiscencia de moscas con interferencia de la expresión de *Rph* (*IR-Rph*) alimentadas con medio estándar (A y B) y suplementado con 1 M de sacarosa (C y D). Las moscas de las gráficas A y C corresponden a hembras, y los de las gráficas B y D son machos. d 1, d 2 y d 3 indican el número de días de edad de las moscas. A día 3 se observa una disminución significativa de los niveles de luminiscencia en las moscas *IR-Rph* alimentadas con una dieta rica en azúcar tanto en hembras como en machos (C y D). Test estadístico: t de Student de 2 colas ($\alpha = 0.05$). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

4.3.2 Cribado farmacológico

Con el objetivo de encontrar fármacos reposicionables con actividad contra el daño renal, testamos la quimioteca Prestwick sobre el fenotipo de daño renal en *Drosophila* descrito previamente. Como se ha mencionado anteriormente las moscas *IR-Rph* y alimentadas con 1 M de sacarosa pierden la hendidura de filtración (pérdida de la expresión de *Sns*), lo cual es semejante a la pérdida de podocitos que ocurre en pacientes diabéticos. Para la búsqueda de fármacos capaces de inhibir dicha pérdida en formato *screening* nos propusimos cuantificar la expresión, indirectamente mediante el reportero luciferasa, de *Sns*. Para ello, realizamos el cruce descrito en el apartado anterior, se recogieron los embriones y tras 24 horas, las larvas de estadio L1 se sembraron en formato de placas de 96 pocillos (Figura 4.3 A). Las placas sembradas se incubaron a 25 °C durante dos semanas; cuando los adultos emergidos cumplieron 3 días de edad, se congelaron y se procesaron como está descrito en el apartado de Material y Métodos del presente capítulo para la lectura de luminiscencia. En total se testaron 1200 compuestos por triplicado (Figura 4.3).

El análisis del cribado se realizó en base a los cambios de la señal de luminiscencia, de forma que, muestras con valores significativamente mayores con respecto a las muestras control se consideraron como compuestos con gran potencial para el tratamiento de daño renal. Del mismo modo, las muestras con valores significativamente menores en comparación con las muestras control fueron considerados como fármacos potencialmente dañinos para el sistema renal. La representación de estos valores se abordó mediante un gráfico de tipo volcán (Figura 4.3). En este gráfico, el eje de ordenadas representa el logaritmo (-log, en base 10) del *p*-valor y el eje de abscisas el logaritmo (en base 2) de la señal de luminiscencia normalizado con respecto al control, es decir, en el eje (x) el 0 indica que no hay cambios y el valor 1 indica que el valor de luminiscencia es el doble que el del control. De esta forma, en el volcán, los cuadrantes D 1 y D 2 contienen los compuestos con mayor lectura de luminiscencia y los cuadrantes I 1 e I 2 contienen los de menor valor. De igual forma, en los cuadrantes D 1 e I 1 se representan los compuestos con un *p*-valor inferior a 0.05 (estadísticamente significativos), en D 2 e I 2 se encuentran los fármacos con un *p*-valor superior a 0.05 (Figura 4.3 B).

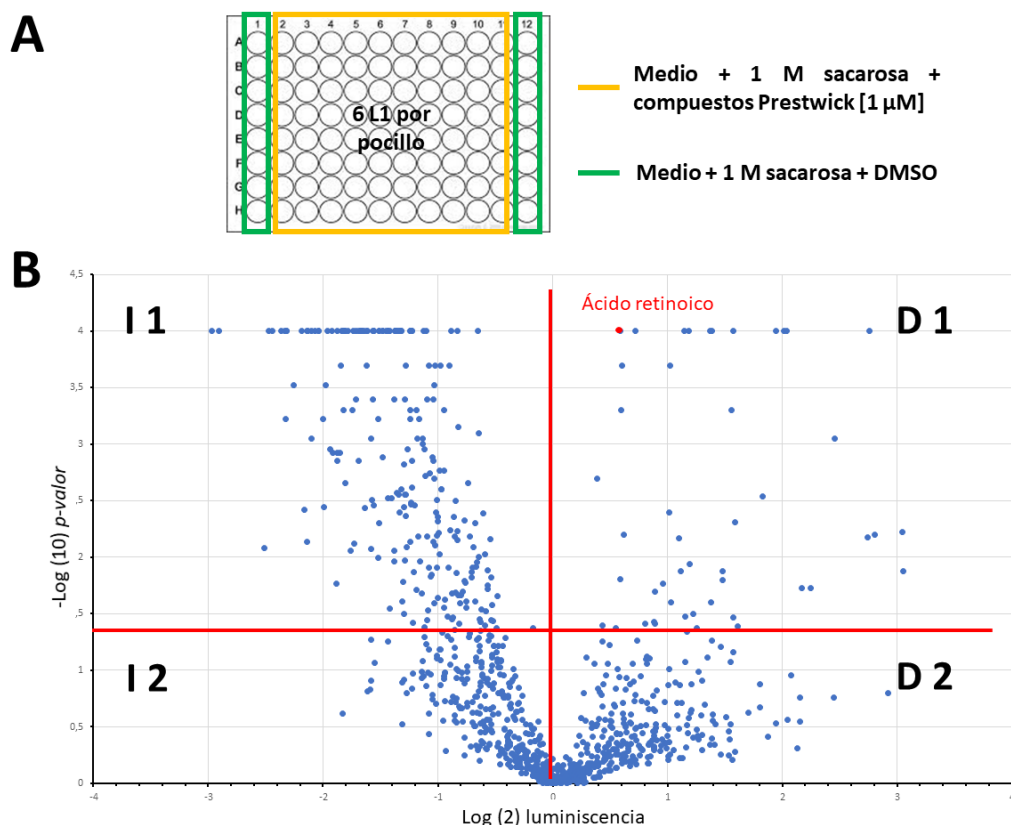


Figura 4.3. Representación del formato en placa de 96 pocillos del cribado y gráfico tipo volcán de las lecturas de luminiscencia procedentes del rastreo de 1200 compuestos de la quimioteca Prestwick. A. Formato de rastreo de compuestos. En cada pocillo se sembraron 6 larvas L1. Las columnas 1 y 12 no contenían fármaco disuelto. La comida con los fármacos se distribuyó en las columnas 2-11 con una concentración final de 1 μ M. B. Las coordenadas x de cada punto son el correspondiente *fold-change* de las lecturas de luminiscencia y las coordenadas y representan el -log en base 10 del *p-valor*. Cada punto representa un compuesto. D 1: fármacos con acción contra el daño renal estadísticamente significativos. I 1: fármacos con acción perjudicial para el daño renal estadísticamente significativos. D 2: fármacos con acción contra el daño renal no estadísticamente significativos. I 2: fármacos con acción perjudicial para el daño renal no estadísticamente significativos. El punto rojo en B representa las coordenadas del ácido retinoico.

De los 1200 compuestos testados, 48 mostraron niveles de luminiscencia significativamente superiores a los controles. Estos compuestos con actividad potencial para contrarrestar el daño renal (compuestos positivos) pertenecen a distintos grupos terapéuticos (Figura 4.4).

Cabe destacar que, de los compuestos positivos, parte son fármacos antidiabéticos como el glibenclamida y glimepirida, otros son glucocorticoides como prednisolona y otros son del grupo antiinflamatorios.

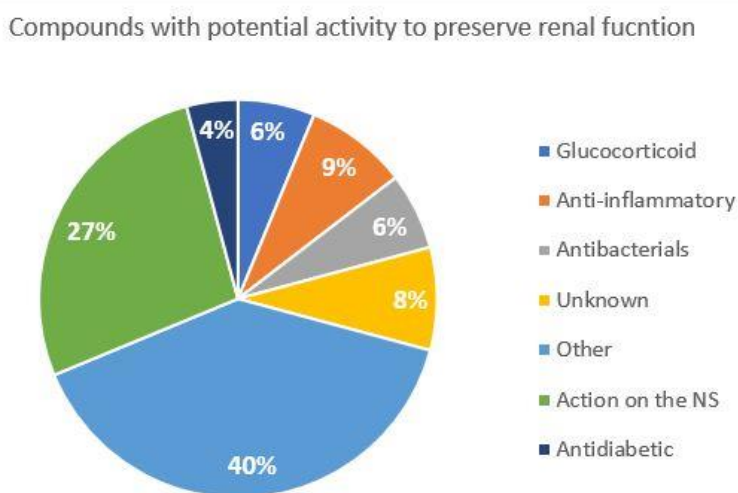


Figura 4.4. Compuestos con actividad potencial para contrarrestar el daño renal (compuestos positivos) de un total de 1200 compuestos procedentes de la quimioteca Prestwick. Los compuestos positivos son glucocorticoides (6%), antiinflamatorios (9%), antibacterianos (6%), desconocidos (8%), con acción moduladora sobre el sistema nervioso (NS) (27%), antidiabéticos (4%) y el resto pertenece a otros grupos terapéuticos (40%).

Uno de estos compuestos positivos es el ácido retinoico (RA), con 0.58 veces mayor señal de luminiscencia y un p-valor menor de 0.0001 (Figura 4.3). Éste fue seleccionado para su posterior validación (Figura 1.9 y Figura 1.10) ya que como se ha descrito en el capítulo 1 de esta memoria, varios estudios muestran que el RA regula la expresión del gen *KLF15* en podocitos^{50,175–177} y éste a su vez regula positivamente la expresión del gen *Nephrin*. Según estos datos, se esperaba que el RA regulara la expresión de *Klf15* en el nefrocito y que este favoreciera la expresión de *Sns*; por lo tanto, esperamos que el RA fuera un potencial compuesto positivo para restablecer el daño renal.

Administramos a moscas *IR-Rph* RA a diferentes concentraciones y realizamos distintos ensayos para dilucidar el efecto de este compuesto sobre los nefrocitos (Figura 1.9 y 1.10 del capítulo 1). Como se muestra en el primer capítulo, el RA favoreció el aumento de nefrocitos funcionales y aumentó la vida media de las moscas *IR-Rph* comparado con las moscas control. Además, este compuesto aumentó los niveles de expresión de *Klf15*, lo que se vio reflejado en un aumento de la expresión de *Sns*. Finalmente, el RA aumentó también la expresión del gen *Cubn*, a niveles del control, y recuperó las estructuras de los canales laberínticos (Figura 1.10). En resumen, el RA restableció los procesos de filtración y parte de la endocitosis en las moscas *IR-Rph*, las cuales exhibían una disminución de la actividad de estos procesos.

4.4 Discusión

La gran cantidad de pacientes con diabetes mellitus que desarrollan una ERC y la falta de fármacos disponibles que puedan parar y revertir la progresión de la ERC, hace necesario la búsqueda de nuevos dianas y medicamentos. Por esto, en este trabajo nos planteamos el reposicionamiento (cribado) de 1200 compuestos comerciales y aprobados por la FDA, procedentes de la quimioteca Prestwick, en un modelo de nefropatía diabética en *Drosophila*. De las 1200 drogas testadas, 48 tuvieron efectos positivos en la regulación de la expresión de *Sns* en los nefrocitos.

Aprovechando las ventajas que supone trabajar con un modelo de *Drosophila* como son tiempo de generación corto, bajo coste económico y gran homología con genes implicados en enfermedades humanas, realizamos un cribado farmacológico. Anteriormente, describimos que, en la mosca, la falta de la proteína Rph conduce a una disminución de la expresión de *Sns*. Asimismo, estudios anteriores mostraron que el modelo de nefropatía diabética de *Drosophila* también muestra una reducción en la expresión de este mismo gen¹⁰⁰. En este trabajo, desarrollamos un modelo con las dos condiciones, interferencia de la expresión del gen *Rph* en un ambiente hiperglucémico. La

combinación de estos dos factores provocó una reducción de la expresión de *Sns* mayor que las condiciones por sí solas, lo que permite tener una ventana de screening mayor y además posibilita descubrir compuestos que pueden ejercer su efecto sobre una condición o en ambas al mismo tiempo.

Parte de los compuestos que mostraron efecto positivo contra el daño renal resultaron ser compuestos antidiabéticos. Esto sugiere que el cribado de fármacos se realizó correctamente y bajo unas condiciones adecuadas, pues cabe esperar que estos compuestos antidiabéticos ejerzan su acción propia reduciendo el efecto tóxico por hiperglucemia. Se conoce que el fármaco canagliflozin, un medicamento que disminuye los niveles de hiperglucemia, administrado a pacientes con diabetes tipo 2 y con enfermedad renal presentaron menor riesgo de sufrir un fallo renal o cardiovascular comparado con pacientes que tomaron placebo²⁰⁸. A pesar de que estos compuestos pueden ser buenos candidatos, se ha visto que resultan perjudiciales cuando la enfermedad se encuentra en un estado avanzado²⁰⁹, un ejemplo de esto son los antidiabéticos glibenclamide y glimepiride²⁰⁹, los cuales mostraron efecto contra el daño renal en este trabajo.

Otro grupo de compuestos que surgieron como positivos son los glucocorticoides. Los glucocorticoides se han usado ampliamente en el tratamiento de pacientes con enfermedad renal^{210,211}. Este grupo de compuestos mejoran la ratio del filtrado glomerular, mantienen el flujo sanguíneo renal e influyen en el metabolismo electrolítico y el balance de agua, entre otras cosas^{211,212}. Curiosamente, el fármaco prednisolone, que pertenece al grupo de los glucocorticoides y se ha demostrado que mejora la ratio del filtrado glomerular²¹² y reduce la apoptosis de los podocitos²¹¹, fue uno de los 48 fármacos que demostró tener efecto positivo en el cribado químico que se realizó en este trabajo.

El efecto beneficioso o positivo de los glucocorticoides en la enfermedad renal podría deberse en parte a la modulación de la respuesta inmune, en concreto la reducción de un estado inflamatorio^{211,213}. Los compuestos antiinflamatorios no-esteroides se han usado para el tratamiento de la ERC²¹⁴. En este trabajo, se muestran varios fármacos que pertenecen al grupo de los antiinflamatorios. Estos resultados muestran que el estado de inflamación podría ser considerado como una de las dianas terapéuticas y la combinación de un medicamento de este grupo con otro tipo de medicamento, como los antidiabéticos, podría dar resultados interesantes.

A pesar de ser utilizados para tratamiento contra esta enfermedad, los glucocorticoides presentan una serie de efectos adversos como inmunodeficiencia, hipertensión, resistencia a la insulina, alteraciones en el tejido adiposo, reducción de la densidad ósea, etc²¹⁵. Por ello es necesario la

búsqueda de nuevos fármacos que puedan tener un efecto notable en la función renal y que no conlleven riesgos o efectos adversos que puedan empeorar la calidad de vida de los pacientes. Entre los compuestos positivos del cribado encontramos medicamentos antidepresivos o con acción sobre el sistema nervioso. Esto puede resultar curioso debido a que estos fármacos no tienen como diana el sistema excretor. No obstante, como se ha mencionado anteriormente, los podocitos y las neuronas presentan características estructurales y moleculares muy similares^{216,217}. Entre otras cosas, ambos tipos celulares presentan el complejo *Rabphilin-3A-Rab3A* que media el tráfico vesicular en éstas¹¹⁰, y también presentan proteínas como synaptopodin y Nephrin (*Sns* en *Drosophila*)^{110,127}. Que *Nephrin*, *Rabphilin-3A* y *Rab 3* se expresen exclusivamente en podocitos y neuronas hace pensar que no es descabellada la idea de que un fármaco con acción neuro-moduladora pueda también afectar o modular la expresión de genes en el sistema renal. Así pues, los fármacos identificados como positivos en el cribado realizado en este trabajo podrían modificar la expresión de *Rph*, *Sns* y *Rab 3*, no sólo en las neuronas sino también en los nefrocitos. Además, se conoce que el podocito posee los mecanismos de la ruta glutamatérgica, y ésta contribuye a la correcta función de la barrera de filtración¹²¹. Se sabe que el bloqueo de los receptores glutamatérgicos, NMDAR, está asociado a proteinuria y a una deslocalización de nephrin en los podocitos; y que un agonista de NMDAR revierte estas alteraciones¹²¹. Una droga antiepiléptica que regula la actividad del receptor NMDA y la exocitosis de vesículas^{218,219}, es uno de los compuestos positivos en nuestro estudio, esto sugiere que la ruta glutamatérgica como posible diana terapéutica. El compuesto que se eligió para una validación profunda fue el RA (capítulo 1). Se escogió el RA por la descripción en trabajos anteriores sobre la modulación de genes específicos del podocito^{50,220}. RA demostró tener un efecto positivo en la regulación de *Sns* mediante la modulación de la expresión de *Klf15* en los nefrocitos y recuperó tanto los procesos de filtración como endocitosis que estaban alterados en los nefrocitos de las moscas *IR-Rph*. Además, como se ha visto en otros trabajos²²¹, la activación de la expresión de *Klf15* por parte del RA, también ayudaría a revertir o parar los efectos del estrés hiperglucémico.

En resumen, uno de los compuestos positivos resultó ser el ácido retinoico, descrito previamente como modulador específico de la actividad de los podocitos y utilizado como terapia para enfermedades renales, lo cual demuestra el potencial de este modelo en el reposicionamiento farmacológico para esta enfermedad. Aunque este fármaco debe ser estudiado con mayor profundidad por los posibles efectos tóxicos que puede desencadenar. A pesar de que se conocen

las dianas de estos compuestos, futuros experimentos serán necesarios para validar y demostrar los mecanismos de actuación de éstos sobre la enfermedad renal.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

La falta de *Rabphilin* causa alteración en los procesos de filtración y endocitosis de los nefrocitos de *Drosophila*.

La expresión de *Rph-3A* está alterada en enfermedades renales en humanos y en modelos de ratón¹¹⁰. Estudios previos mostraron que un polimorfismo en el gen *Rph-3A* aumenta el riesgo de presentar microalbuminuria¹⁰⁹. Sin embargo, poco se sabe sobre el papel de esta proteína en el sistema renal y en concreto en los podocitos.

El difícil acceso a los podocitos en los modelos de mamíferos y la dificultad de obtener una línea con una alteración en este gen concreto, junto con la imposibilidad de que los podocitos en cultivo formen la hendidura de filtración; convirtieron a *Drosophila* en nuestra herramienta de estudio para la caracterización de la función del gen *Rph* por primera vez en un modelo de enfermedad renal. *Drosophila* posee un alto grado de conservación de las estructuras de filtración entre los podocitos humanos y los nefrocitos. Así pues los nefrocitos, que son muy similares estructural, funcional y molecularmente a los podocitos, se convierten en un modelo simplificado para el estudio de los podocitos, que llevan a cabo el proceso de filtración, y del túbulo proximal renal, especializado en la reabsorción de proteínas¹⁶⁸.

En este estudio, mostramos que *Rph*, efector de las proteínas *Rabs*, se expresa en los nefrocitos pericárdicos de *Drosophila* junto con las proteínas *Rab 3* y *Rab 27*. La colocalización de *Rph* con estas proteínas *Rabs* y con un marcador de vesículas endocíticas, *Hrs*, indica que *Rph* está implicado en el tráfico vesicular endocítico y exocítico^{110,112,172,173}. Los niveles de proteína *Rab 3*, implicada en el transporte y localización de *Nephrin* en el podocito^{110,127}, disminuyeron cuando la expresión del gen *Rph* estaba interferida, lo que sugiere un bloqueo de la endocitosis y la exocitosis mediada por *Rab 3* y una desorganización de los NDs, lo cual se observa en las imágenes de TEM.

La pérdida de *Rph* tiene como consecuencia una reducción de la expresión del marcador de nefrocitos diferenciados (y de podocitos), *Klf15*. Esto podría ser explicado por la alteración en la ruta endocítica ya que varios estudios muestran que la vía endocítica juega un papel importante en el desarrollo, mantenimiento y daño del podocito y puede conducir a alteraciones en la morfología celular^{69,129,178}. De ahí que los nefrocitos IR-*Rph* mostraran cambios en el volumen y que esto causara finalmente una disminución en su número. En consecuencia, hemos demostrado una reducción

dependiente del tiempo en el número de nefrocitos en moscas adultas *IR-Rph*, que fue concomitante con la pérdida de la expresión de *Klf15*.

La reducción de la expresión de *Sns* (ortólogo de *Nephrin*) y *Cubn* cuando los niveles de *Rph* eran bajos, también apuntan a la perturbación de la filtración y la ruta endocítica, respectivamente. El sistema Cubilin-Amnionless se encarga de la endocitosis de proteínas de pequeño tamaño a través de los canales laberínticos^{39,63}. Ambos sistemas pueden ser alterados por una reducción en la expresión del gen o por la mala localización de cualquiera de sus componentes. Además, según nuestros análisis de las imágenes TEM, los canales laberínticos están ausentes en los nefrocitos *IR-Rph*, lo cual confirma la interrupción de la endocitosis de moléculas, lo que sugiere un papel para *Rph* en la reabsorción de proteínas, presumiblemente por la modulación de la expresión de *Cubilin*. En conclusión, la falta de *Rph* afecta a la actividad de los nefrocitos a dos niveles: la filtración por alteración de los NDs y de la membrana basal, y la endocitosis por la ausencia del sistema Cubn-Amn (y ausencia de canales laberínticos). Como resultado ocurre una disrupción del tráfico vesicular que conduce a una pérdida del estado diferenciado del nefrocito y la subsiguiente pérdida del número de nefrocitos funcionales.

La pérdida de función de *Rph*, en el sistema cardiaco y renal de *Drosophila*, causa alteraciones cardiacas.

Se conoce que hay una relación bidireccional entre el sistema renal y el sistema cardiaco en humanos¹³². Por lo tanto, también se conoce el nexo entre la enfermedad renal crónica y la insuficiencia cardiaca. No obstante, los mecanismos y las rutas implicadas en esta relación entre los podocitos y la función cardiaca aún no están claras. En este trabajo, mostramos como *Rabphilin*, una proteína que está descrita en los podocitos en humanos y otros animales, se expresa también en el corazón de *Drosophila*.

Aunque *Drosophila* no tiene un sistema circulatorio cerrado, la mosca posee un tubo cardiaco compuesto por pares de cardiomiocitos que tienen fibras contráctiles orientadas circularmente¹⁹². Alrededor de este corazón sencillo encontramos los nefrocitos pericárdicos. Debido a las herramientas genéticas que disponemos para el estudio en *Drosophila*, es posible estudiar en este animal la influencia que ambos sistemas tienen el uno sobre el otro y la implicación de *Rabphilin* en éstos de una forma independiente y conjunta.

En *Drosophila*, algunos estudios han mostrado que los nefrocitos pericárdicos pueden ejercer un efecto paracrino en el sistema cardíaco¹⁸⁴ y que la pérdida de nefrocitos en los primeros estadios de desarrollo puede ocasionar defectos en la cardiogénesis^{189–191}. No obstante, otros autores afirman que no existe tal comunicación entre ambos sistemas⁴⁶.

En este estudio, mostramos que la interferencia de la expresión de *Rph* en cardiomiocitos y nefrocitos pericárdicos simultáneamente conlleva a la aparición de alteraciones cardíacas como un incremento en el intervalo diastólico, una dilatación de la cámara cardíaca y una desorganización de las miofibrillas. Esta disfunción del sistema cardíaco se vio reflejada con una reducción drástica en la supervivencia. Estas alteraciones cardíacas podrían deberse en sí al posible papel de *Rph* en el corazón y no por la influencia del sistema renal de la mosca sobre el sistema cardíaco. Al reducir la expresión de *Rph* sólo en los nefrocitos pericárdicos, los efectos en el corazón no fueron tan drásticos. No obstante, se detectaron alteraciones como un aumento en el diámetro diastólico. Es importante destacar que, aunque pequeña, esta alteración fue suficiente para causar una reducción significativa de la vida media.

Nuestros datos indican que *Rph* no sólo sería importante para el correcto funcionamiento de los nefrocitos, sino que también es relevante para la función y la organización estructural de las células del corazón. Además, la ausencia de *Rph* en el sistema excretor tendría un impacto negativo en el sistema cardíaco, lo que apoya la teoría del efecto no autónomo a distancia descrito en algunos trabajos anteriores.

La desorganización estructural de las miofibrillas descritas en este trabajo, a causa de la pérdida de expresión de *Rph* en el corazón, también demuestran la función de *Rph* de unión a los filamentos de actina del citoesqueleto y la reorganización de éstos descritos previamente en otras investigaciones^{113,120}. La falta de coordinación en el ensamblaje de las moléculas de actina y la incorrecta disposición de éstas podría ser la causa del aumento de los diámetros diastólicos y sistólicos que encontramos en los corazones de las moscas con interferencia de la expresión de *Rph*. La desorganización de la actina podría estar contribuyendo al aumento de los diámetros diastólicos y sistólicos que observamos en las moscas con interferencia de *Rph* y también podría ser la causa de la disminución del grosor de la pared en el corazón de *Drosophila*. Un ejemplo de esto se ha visto en pacientes que presentan mutaciones en genes que codifican proteínas que controlan la interacción de actina con otras proteínas o en genes que codifican para componentes del citoesqueleto, como la misma actina, los cuales cursan con la aparición de miocardiopatía^{193–195}, que

se caracteriza por un agrandamiento de las cámaras cardíacas, concretamente en el ventrículo izquierdo.

En conclusión, nuestro trabajo sugiere que *Rph* tiene una función importante tanto en el corazón como en los nefrocitos de *Drosophila*, y una alteración en los niveles de *Rph* en el sistema excretor tendría consecuencias negativas en el sistema cardíaco, lo que sugiere una posible relación entre ambos sistemas y, en consecuencia, en la aparición de enfermedades en ambos órganos.

Las proteínas Rabs son necesarias para el mantenimiento de las estructuras de filtración y endocitosis de los nefrocitos.

Las proteínas Rab, proteínas involucradas en regular, coordinar y organizar el tráfico vesicular en diversos tipos celulares están implicadas en el mantenimiento e integridad de los nefrocitos y los podocitos. Trabajos anteriores han asociado a las proteínas Rab 8, Rab 5, Rab 34 y Rab 38 con funciones clave para el funcionamiento de los podocitos. En esta memoria mostramos que Rab 3 y Rab 27 tienen una función relevante en la filtración y la endocitosis de los nefrocitos.

Una disrupción en el transporte vesicular de las células conlleva a la desorganización del citoesqueleto de éstas y a la consecuente pérdida de función. Alteraciones en la actividad de las proteínas Rabs en los nefrocitos tuvieron un impacto en el citoesqueleto. Tanto la falta como el aumento de la actividad de las proteínas Rab 3 y Rab 27 provocaron cambios en la morfología y el tamaño de los NDs. En algunos casos la hendidura de filtración se encontraba desorganizada, resultando imposible determinar el tamaño exacto del poro de los NDs. Además, los canales laberínticos estaban significativamente reducidos en tamaño o estaban ausentes. Se ha descrito que las proteínas Rab GTPasas, podrían desempeñar un papel fundamental en la regulación de la composición de la membrana extracelular en la nefropatía diabética²⁰⁴.

Según nuestro estudio, Rab 3 parece regular de algún modo la expresión de *Sns* y *Kirre*, componentes de los NDs, ya que la activación constitutiva de Rab 3 provoca un claro aumento de la señal de *Sns* y *Kirre* tal y como se ve en las imágenes del ensayo de inmunofluorescencia. Del mismo modo, alteraciones en la actividad de Rab 27 promueven la pérdida de señal de *Sns* y *Kirre*. Así pues, nuestros resultados sugieren que estas proteínas Rabs podrían mediar la expresión y el transporte de moléculas que forman parte de la hendidura de filtración.

Estos cambios estructurales se vieron reflejados en cambios funcionales, como cambios en los niveles de captación y filtración de distintas moléculas como dextranos, nitrato de plata y el análogo de la glucosa, 2-NBDG, que tuvieron impactos en la supervivencia de las moscas.

La nefropatía diabética es una de las principales causas del daño renal. Aproximadamente el 40 % de los pacientes diabéticos desarrollan nefropatía diabética. Se conoce que en esta enfermedad podrían estar implicadas las proteínas Rab. Goldenberg et al. 2009²⁰³ describió que la proteína Rab 34, implicada en el transporte vesicular en podocitos²⁰⁵ y su efector munc13-2, sobreexpresada en pacientes con diabetes, promueven la secreción de fibronectina por parte del podocito en un ambiente con elevada concentración de glucosa²⁰³. Además, otra Rab que podría estar implicada es la Rab38. La expresión de Rab 38 se encuentra incrementada en el túbulo y glomérulos de pacientes con nefropatía diabética. En nuestro modelo de nefropatía diabética observamos que el nivel de la expresión del gen *Rab 3* era 4 veces superior en las moscas diabéticas con respecto a las moscas control y que los niveles de *Rph* se encontraban disminuidos. La expresión de *Rab 3* y la de su efector *Rph* está alterada en enfermedades proteinúricas, tanto en humanos como en animales modelo y cultivos celular. Nuestros resultados, junto con los datos de otras investigaciones, sugieren que Rab 3 y *Rph* tendrían un papel relevante en la aparición y progresión de la nefropatía diabética.

Nuestros datos muestran que Rab 3 y Rab 27 están implicados en el mantenimiento y organización del citoesqueleto de los nefrocitos, concretamente en la formación de los NDs y de los canales laberínticos, por lo que serían determinantes para las funciones de filtración, endocitosis y tráfico vesicular del nefrocito. La alteración en la actividad de las proteínas Rab y sus efectores, en concreto el complejo *Rabphilin-Rab* (3 o 27), tendría como consecuencia la pérdida de función de los nefrocitos lo que provoca la desdiferenciación de la célula y acaba repercutiendo en la viabilidad del animal. Además, nuestros resultados indican que los niveles de Rab 3 y su efector *Rph* están alterados en la nefropatía diabética. Esto abre una vía para el estudio de estas proteínas como posibles marcadores o dianas terapéuticas en la aparición de la enfermedad.

El ácido retinoico, compuesto con actividad positiva contra el daño renal en el cribado farmacológico en la mosca.

Aproximadamente, el 10% de la población mundial presenta enfermedad renal crónica (ERC). La ERC supone que ésta puede convertirse en una enfermedad terminal y aumenta el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular que comprometa la vida del paciente⁷⁻⁹. La gran cantidad de

pacientes que sufren ERC, el riesgo que supone la enfermedad y la falta de fármacos disponibles que puedan parar y revertirla hace necesario la búsqueda de nuevas dianas y medicamentos. En este trabajo hemos demostrado como alteraciones en el complejo *Rab-Rabphilin* y un ambiente hiperglucémico persistente, alteraciones que se han visto asociadas a la aparición de proteinuria en humanos y modelos de enfermedades renales, logran establecer una enfermedad renal en un modelo de daño renal. Por esto, en este trabajo nos planteamos el reposicionamiento (cribado) de 1200 compuestos comerciales y aprobados por la FDA, procedentes de la quimioteca Prestwick, en un modelo de nefropatía diabética en *Drosophila*.

Las ventajas que supone trabajar con *Drosophila*, descritas en el apartado de la introducción, hizo posible realizar un cribado de fármacos con el fin de detectar medicamentos que tengan acción contra el daño renal, en concreto que puedan parar o revertir las lesiones provocadas por mutaciones en el complejo Rab-Rabphilin y por la hiperglucemia. Ambas condiciones tienen en común la reducción de la expresión de *Sns* (ortólogo de Nephin), componente de la hendidura de filtración. La combinación de los dos factores supuso que los niveles de *Sns* fueran inferiores, lo que nos permitió tener mayor ventana en el cribado y además posibilita descubrir compuestos que pueden ejercer su efecto sobre una condición o en ambas al mismo tiempo.

De los 1200 compuestos testados, 48 de ellos mostraron niveles de expresión de *Sns* significativamente mayores con respecto a los controles, es decir, 48 fármacos tuvieron efecto positivo contra el daño renal. Algunos de los compuestos positivos pertenecieron al grupo de medicamentos antidiabéticos, lo cual era esperable debido a que se trataban de drogas que disminuían los niveles de azúcar en el sistema circulatorio (en la hemolinfa de las moscas). Un ejemplo de esto son los antidiabéticos glibenclamida y glimepirida²⁰⁹, los cuales ya han sido testados en pacientes. Otro grupo de compuestos que surgieron como positivos son los glucocorticoides. Éstos ya han sido descritos como tratamiento de la ERC^{210,211}, concretamente, el fármaco prednisona²¹², que también resultó ser uno de los compuestos positivos del cribado. Las drogas que pertenecen al grupo de los antiinflamatorios también forman parte de la lista de compuestos con efecto positivo. Los compuestos antiinflamatorios no-esteroides se han usado para el tratamiento de la ERC²¹⁴. Además, se ha descrito que los glucocorticoides logran parte de su efecto debido a la modulación de la respuesta inmune, en concreto la reducción de un estado inflamatorio^{211,213}. Todo esto convierte al estado inflamatorio como una posible diana terapéutica. A pesar de ser utilizados ampliamente como tratamiento, los glucocorticoides presentan una serie de efectos adversos como inmunodeficiencia, hipertensión, resistencia a la insulina, alteraciones en

el tejido adiposo, reducción de la densidad ósea, etc²¹⁵. Por ello es necesario la búsqueda de nuevos fármacos.

Otra parte de compuestos que mostraron acción contra el daño renal fueron medicamentos con acción en el sistema nervioso, en concreto 15 drogas de 48 (31.25 %). Esto se podría explicar por las similitudes entre los podocitos y las neuronas^{216,217}. Ambos tipos celulares expresan el *complejo Rab-Rabphilin* y *Nephrin* y comparten rutas y mecanismos del transporte vesicular¹¹⁰. Los fármacos identificados como positivos en el cribado y que tienen acción en el sistema nervioso podrían modificar la expresión de *Rph*, *Sns* y *Rab 3*, no sólo en las neuronas sino también en los nefrocitos. Otra de las características que comparten las neuronas y los podocitos es que ambos tipos celulares poseen mecanismos de la ruta glutamatérgica. Alteraciones en los receptores glutamatérgicos NMDAR están asociados a la aparición de proteinuria y a la pérdida de la barrera de filtración por la deslocalización de *Nephrin*¹²¹. Interesantemente, levetiracetam, una droga antiepiléptica que regula la actividad del receptor NMDA y la exocitosis de vesículas^{218,219}, es uno de los compuestos positivos en nuestro estudio. Esto otorga a la ruta glutamatérgica gran importancia para el estudio de las enfermedades renales.

De entre los diferentes fármacos potenciales para una etapa de validación, se eligió al ácido retinoico por la descripción en trabajos anteriores sobre la modulación de genes específicos del podocito^{50,220}. Los nefrocitos tratados con RA mostraron niveles de expresión de *Sns* y *Cubn* similares a los nefrocitos control (Figura 1.10 E y G), presentaron canales laberínticos (Figura 1.10 I) y pudieron llevar a cabo la función de filtración (Figura 1.10 C') y parcialmente la endocitosis (Figura 1.10 D'). RA demostró tener un efecto positivo en la regulación de *Sns* mediante la modulación de la expresión de *Klf15* en los nefrocitos y como se ha visto en otros trabajos²²¹, la activación de la expresión de *Klf15* por parte del RA, también ayudaría a revertir o parar los efectos del estrés hiperglucémico.

Finalmente, en este trabajo desarrollamos un modelo de *Drosophila* para la búsqueda de fármacos, ya disponibles y comerciales, con el objetivo de encontrar un compuesto con acción positiva contra el daño renal, capaz de parar y revertir la progresión de la enfermedad renal. De las 1200 drogas testadas, 48 tuvieron efectos positivos en la regulación de la expresión de *Sns* en los nefrocitos. Lo que los convierte en potenciales medicamentos terapéuticos. A pesar de que se conocen las dianas de estos compuestos, es necesario profundizar en los distintos mecanismos en los que actúan a nivel del sistema excretor, y en concreto a nivel del glomérulo renal.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer a partir de los resultados presentados en este trabajo son las siguientes:

1. La falta de *Rabphilin* en los nefrocitos de *Drosophila* conduce a defectos en la organización del citoesqueleto como la formación de los canales laberínticos, alteración de la membrana basal y disminución del tráfico vesicular intracelular, concretamente de endosomas y vesículas Rab 3 positivas.
2. Los bajos niveles *Rabphilin* en los nefrocitos promueve la infraexpresión de los genes *Sns* y *Cubn*, esenciales para la filtración y la endocitosis, respectivamente. Lo que se traduce en la pérdida de funciones propias del nefrocito que conlleva a la disminución de la supervivencia.
3. La falta de función de *Rabphilin* en el corazón conlleva a la aparición de alteraciones cardíacas típicas de una cardiomiopatía dilatada acompañadas de una desorganización de las miofibrillas cardíacas que tienen como consecuencia una disminución de la vida media.
4. La ausencia de *Rabphilin* en los nefrocitos tiene un efecto a no autónomo a distancia sobre el corazón de la mosca que se caracteriza por un intervalo diastólico prolongado y una vida media más corta.
5. Las proteínas Rab 3 y Rab 27 son esenciales para la localización y la expresión de las proteínas de la hendidura de filtración y de los canales laberínticos de los nefrocitos. Por lo que participan en el proceso de filtración, endocitosis y en el estado de mantenimiento del nefrocito.
6. Los niveles de los componentes que forman el complejo *Rab-Rabphilin* se encuentran alterados en el modelo de nefropatía diabética. Lo que sugiere que estas proteínas están involucradas en la aparición y desarrollo de la enfermedad.
7. El modelo de enfermedad renal de la mosca es una importante herramienta *in vivo* para la búsqueda de compuestos con actividad contra el daño renal. En este sentido, el ácido retinoico, compuesto positivo del cribado, logró rescatar la expresión de los genes alterados, los problemas de filtración y parte de la endocitosis en el modelo de enfermedad renal en *Drosophila*.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Vaninetti, M. & Valovska, A. Renal physiology. in *Essential Clinical Anesthesia Review: Keywords, Questions and Answers for the Boards* (2015). doi:10.1017/CBO9781139584005.098
2. Khan, K. N. M., Hard, G. C., Li, X. & Alden, C. L. Urinary System. in *Fundamentals of Toxicologic Pathology: Third Edition* (2017). doi:10.1016/B978-0-12-809841-7.00011-3
3. Sembulingam, P., Sembulingam, K. & Sembulingam, P. Nephron. in *Essentials of Physiology for Dental Students* (2016). doi:10.5005/jp/books/12902_40
4. Pollak, M. R., Quaggin, S. E., Hoenig, M. P. & Dworkin, L. D. The glomerulus: The sphere of influence. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* (2014). doi:10.2215/CJN.09400913
5. Helmstädtter, M. & Simons, M. Using Drosophila nephrocytes in genetic kidney disease. *Cell Tissue Res.* **369**, 119–126 (2017).
6. National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Clasification and Stratification. *Am J Kidney Dis.* (2002). doi:10.1634/theoncologist.2011-S2-45
7. Go, A. S. *et al.* Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* (2004). doi:10.1056/NEJMoa041031
8. CS, F. *et al.* Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis. *Lancet* (2012). doi:10.1016/S0140-6736(12)61350-6
9. Brosius, F. C. *et al.* Detection of Chronic Kidney Disease in Patients With or at Increased Risk of Cardiovascular Disease. *Hypertension* (2006). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.177321
10. Comper, W. D., Hilliard, L. M., Nikolic-Paterson, D. J. & Russo, L. M. Disease-dependent mechanisms of albuminuria. *Am. J. Physiol. Physiol.* (2008). doi:10.1152/ajprenal.00142.2008
11. Haraldsson, B., Nystrom, J. & Deen, W. M. Properties of the Glomerular Barrier and Mechanisms of Proteinuria. *Physiol. Rev.* (2008). doi:10.1152/physrev.00055.2006
12. Grahammer, F., Schell, C. & Huber, T. B. The podocyte slit diaphragm - From a thin grey line to a complex signalling hub. *Nature Reviews Nephrology* (2013). doi:10.1038/nrneph.2013.169
13. Kawachi, H. *et al.* Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology* (2006). doi:10.1111/j.1440-1797.2006.00583.x
14. He, F.-F., Chen, S., Su, H., Meng, X.-F. & Zhang, C. Actin-associated Proteins in the Pathogenesis of Podocyte Injury. *Curr. Genomics* (2013). doi:10.2174/13892029113146660014
15. Perico, L., Conti, S., Benigni, A. & Remuzzi, G. Podocyte-actin dynamics in health and disease. *Nature Reviews Nephrology* (2016). doi:10.1038/nrneph.2016.127
16. Suleiman, H. Y. *et al.* Injury-induced actin cytoskeleton reorganization in podocytes revealed by super-resolution microscopy. *JCI Insight* (2017). doi:10.1172/jci.insight.94137
17. Abbate, M., Zoja, C. & Remuzzi, G. How Does Proteinuria Cause Progressive Renal Damage?

J. Am. Soc. Nephrol. (2006). doi:10.1681/asn.2006040377

18. Mundel, P. & Shankland, S. J. Podocyte biology and response to injury. *Journal of the American Society of Nephrology* (2002). doi:10.1097/01.ASN.0000039661.06947.FD
19. Nagata, M. Podocyte injury and its consequences. *Kidney International* (2016). doi:10.1016/j.kint.2016.01.012
20. Vogelmann, S. U., Nelson, W. J., Myers, B. D. & Lemley, K. V. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am. J. Physiol. Physiol.* (2003). doi:10.1152/ajprenal.00404.2002
21. Pagtalunan, M. E. *et al.* Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J. Clin. Invest.* (1997). doi:10.1172/JCI119163
22. Nagase, M. *et al.* Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker. *Hypertension* (2006). doi:10.1161/01.HYP.0000222003.28517.99
23. Wang, G. *et al.* Podocyte loss in human hypertensive nephrosclerosis. *Am. J. Hypertens.* (2009). doi:10.1038/ajh.2008.360
24. Kerjaschki, D. & Neale, T. J. Molecular mechanisms of glomerular injury in rat experimental membranous nephropathy (Heymann nephritis). *J. Am. Soc. Nephrol.* (1996).
25. Ronco, P. & Debiec, H. Molecular Pathomechanisms of Membranous Nephropathy: From Heymann Nephritis to Alloimmunization. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2005). doi:10.1681/asn.2004121080
26. Tryggvason, K., Ruotsalainen, V. & Wartiovaara, J. Discovery of the congenital nephrotic syndrome gene discloses the structure of the mysterious molecular sieve of the kidney. *International Journal of Developmental Biology* (1999).
27. Kestilä, M. *et al.* Positionally cloned gene for a novel glomerular protein - Nephrin - Is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell* (1998). doi:10.1016/S1097-2765(00)80057-X
28. Shankland, S. J. The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney International* (2006). doi:10.1038/sj.ki.5000410
29. Akchurin, O. & Reidy, K. J. Genetic causes of proteinuria and nephrotic syndrome: Impact on podocyte pathobiology. *Pediatric Nephrology* (2014). doi:10.1007/s00467-014-2753-3
30. Rizvi, S. Association of genetic variants with diabetic nephropathy. *World J. Diabetes* (2014). doi:10.4239/wjd.v5.i6.809
31. Brennan, E., McEvoy, C., Sadlier, D., Godson, C. & Martin, F. The genetics of diabetic nephropathy. *Genes* (2013). doi:10.3390/genes4040596
32. Boute, N. *et al.* NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat. Genet.* (2000). doi:10.1038/74166
33. Kaplan, J. M. *et al.* Mutations in ACTN4, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Genet.* (2000). doi:10.1038/73456
34. Kopp, J. B., Winkler, C. A. & Nelson, G. W. MYH9 genetic variants associated with glomerular disease: What is the role for genetic testing? *Semin. Nephrol.* (2010).

doi:10.1016/j.semnephrol.2010.06.007

35. Kopp, J. B. *et al.* MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Genet.* (2008). doi:10.1038/ng.226
36. Schlöndorff, J., del Camino, D., Carrasquillo, R., Lacey, V. & Pollak, M. R. TRPC6 mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis cause constitutive activation of NFAT-dependent transcription. *Am. J. Physiol. Physiol.* (2009). doi:10.1152/ajpcell.00077.2008
37. Simons, M. & Huber, T. B. Flying podocytes. *Kidney International* (2009). doi:10.1038/ki.2008.653
38. Weavers, H. *et al.* The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm. *Nature* **457**, 322–326 (2009).
39. Hermle, T., Braun, D. A., Helmstädter, M., Huber, T. B. & Hildebrandt, F. Modeling Monogenic Human Nephrotic Syndrome in the *Drosophila* Garland Cell Nephrocyte. *J. Am. Soc. Nephrol.* **28**, 1521–1533 (2017).
40. Denholm, B. & Skaer, H. Bringing together components of the fly renal system. *Current Opinion in Genetics and Development* (2009). doi:10.1016/j.gde.2009.08.006
41. Kowalevsky, A. Beitrag zur Kenntniss der Exkretionsorgane. Mollusken. *Biol. Cent.* (1889).
42. Mills, R. P. & King, R. C. The pericardial cells of *Drosophila melanogaster*. *Q. J. Microsc. Sci.* (1965).
43. Aggarwal, S. K. & King, R. C. The ultrastructure of the wreath cells of *Drosophila melanogaster* larvae. *Protoplasma* (1967). doi:10.1007/BF01252944
44. Crossley, A. C. The ultrastructure and function of pericardial cells and other nephrocytes in an insect: *Calliphora erythrocephala*. *Tissue Cell* (1972). doi:10.1016/S0040-8166(72)80029-6
45. Rugendorff, A., Younossi-Hartenstein, A. & Hartenstein, V. Embryonic origin and differentiation of the *Drosophila* heart. *Roux's Arch. Dev. Biol.* (1994). doi:10.1007/BF00360522
46. Das, D., Aradhya, R., Ashoka, D. & Inamdar, M. Post-embryonic pericardial cells of *Drosophila* are required for overcoming toxic stress but not for cardiac function or adult development. *Cell Tissue Res.* (2008). doi:10.1007/s00441-007-0518-z
47. Ward, E. J. & Skeath, J. B. Characterization of a novel subset of cardiac cells and their progenitors in the *Drosophila* embryo. *Development* (2000).
48. Sellin, J., Albrecht, S., Kölsch, V. & Paululat, A. Dynamics of heart differentiation, visualized utilizing heart enhancer elements of the *Drosophila melanogaster* bHLH transcription factor Hand. *Gene Expr. Patterns* (2006). doi:10.1016/j.modgep.2005.09.012
49. Ivy, J. R. *et al.* Klf15 is critical for the development and differentiation of drosophila nephrocytes. *PLoS One* **10**, (2015).
50. Mallipattu, S. K. *et al.* Krüppel-like factor 15 (KLF15) is a key regulator of podocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* (2012). doi:10.1074/jbc.M112.345983
51. Mallipattu, S. K., Estrada, C. C. & He, J. C. The critical role of Krüppel-like factors in kidney disease. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* (2017). doi:10.1152/ajprenal.00550.2016

52. Hartley, P. S., Motamedchaboki, K., Bodmer, R. & Ocorr, K. SPARC-dependent cardiomyopathy in drosophila. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **9**, 119–129 (2016).
53. Schefold, J. C., Filippatos, G., Hasenfuss, G., Anker, S. D. & Von Haehling, S. Heart failure and kidney dysfunction: Epidemiology, mechanisms and management. *Nat. Rev. Nephrol.* (2016). doi:10.1038/nrneph.2016.113
54. Zhuang, S. *et al.* Sns and Kirre, the Drosophila orthologs of Nephrin and Neph1, direct adhesion, fusion and formation of a slit diaphragm-like structure in insect nephrocytes. *Development* **136**, 2335–2344 (2009).
55. Zhang, F., Zhao, Y. & Han, Z. An In Vivo Functional Analysis System for Renal Gene Discovery in Drosophila Pericardial Nephrocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 191–197 (2013).
56. Tutor, A. S., Prieto-Sanchez, S. & Ruiz-Gomez, M. Src64B phosphorylates Dumbfounded and regulates slit diaphragm dynamics: Drosophila as a model to study nephropathies. *Development* **141**, 367–376 (2014).
57. Narita, K., Tsuruhara, T., Koenig, J. H. & Ikeda, K. Membrane pinch-off and reinsertion observed in living cells of Drosophila. *J. Cell. Physiol.* (1989). doi:10.1002/jcp.1041410220
58. Lloyd, T. E. *et al.* Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in Drosophila. *Cell* (2002). doi:10.1016/S0092-8674(02)00611-6
59. Kim, S., Wairkar, Y. P., Daniels, R. W. & DiAntonio, A. The novel endosomal membrane protein Ema interacts with the class C Vps-HOPS complex to promote endosomal maturation. *J. Cell Biol.* (2010). doi:10.1083/jcb.200911126
60. Lőrincz, P. *et al.* MiniCORVET is a Vps8-containing early endosomal tether in drosophila. *Elife* (2016). doi:10.7554/eLife.14226
61. Vijayakrishnan, N., Woodruff, E. A. & Broadie, K. Rolling blackout is required for bulk endocytosis in non-neuronal cells and neuronal synapses. *J. Cell Sci.* (2009). doi:10.1242/jcs.050047
62. Gleixner, E. M. *et al.* V-ATPase/mTOR Signaling Regulates Megalin-Mediated Apical Endocytosis. *Cell Rep.* (2014). doi:10.1016/j.celrep.2014.05.035
63. Zhang, F., Zhao, Y., Chao, Y., Muir, K. & Han, Z. Cubilin and Amnionless Mediate Protein Reabsorption in Drosophila Nephrocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 209–216 (2013).
64. Zhang, F. & Chen, X. The drosophila nephrocyte has a glomerular filtration system. *Nat. Rev. Nephrol.* **10**, 491 (2014).
65. Nielsen, R., Christensen, E. I. & Birn, H. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: From experimental models to human disease. *Kidney International* (2016). doi:10.1016/j.kint.2015.11.007
66. Prabakaran, T., Christensen, E. I., Nielsen, R. & Verroust, P. J. Cubilin is expressed in rat and human glomerular podocytes. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2012). doi:10.1093/ndt/gfr794
67. Fu, Y. *et al.* A Drosophila model system to assess the function of human monogenic podocyte mutations that cause nephrotic syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 768–780 (2017).
68. Tepass, U. & Hartenstein, V. The development of cellular junctions in the Drosophila embryo. *Dev. Biol.* (1994). doi:10.1006/dbio.1994.1054

69. Hochapfel, F. *et al.* Distinct functions of Crumbs regulating slit diaphragms and endocytosis in *Drosophila* nephrocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 4573–4586 (2017).
70. Shih, N. Y. *et al.* Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* (80-.). (1999). doi:10.1126/science.286.5438.312
71. Shi, N. Y. *et al.* CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am. J. Pathol.* (2001). doi:10.1016/S0002-9440(10)63080-5
72. Huber, T. B. *et al.* The carboxyl terminus of Neph family members binds to the PDZ domain protein zonula occludens-1. *J. Biol. Chem.* (2003). doi:10.1074/jbc.C200678200
73. Schwarz, K. *et al.* Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J. Clin. Invest.* (2001). doi:10.1172/JCI200112849
74. Singh, S. R., Liu, W. & Hou, S. X. The Adult *Drosophila* Malpighian Tubules Are Maintained by Multipotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* (2007). doi:10.1016/j.stem.2007.07.003
75. Beyenbach, K. W., Skaer, H. & Dow, J. A. T. The Developmental, Molecular, and Transport Biology of Malpighian Tubules. *Annu. Rev. Entomol.* (2010). doi:10.1146/annurev-ento-112408-085512
76. Maddrell, S. H. P. The Functional Design of the Insect Excretory System. *J. Exp. Biol.* (1981).
77. Denholm, B. *et al.* Dual origin of the renal tubules in *Drosophila*: Mesodermal cells integrate and polarize to establish secretory function. *Curr. Biol.* (2003). doi:10.1016/S0960-9822(03)00375-0
78. Dow, J. A. T. Insights into the Malpighian tubule from functional genomics. *J. Exp. Biol.* **212**, 435–445 (2009).
79. Saleem, M. A. *et al.* A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2002).
80. Aminoff, M. *et al.* Mutations in CUBN, encoding the intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, cause hereditary megaloblastic anaemia 1. *Nat. Genet.* (1999). doi:10.1038/6831
81. Tanner, S. M. *et al.* Amnionless, essential for mouse gastrulation, is mutated in recessive hereditary megaloblastic anemia. *Nat. Genet.* (2003). doi:10.1038/ng1098
82. Pandey, U. B. & Nichols, C. D. Human disease models in *drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol. Rev.* (2011). doi:10.1124/pr.110.003293
83. Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* (1993).
84. Yamaguchi, M. & Yoshida, H. *Drosophila* as a model organism. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* (2018). doi:10.1007/978-981-13-0529-0_1
85. Kruzel-Davila, E. *et al.* APOL1–Mediated Cell Injury Involves Disruption of Conserved Trafficking Processes. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2017). doi:10.1681/asn.2016050546
86. Fu, Y. *et al.* APOL1-G1 in Nephrocytes Induces Hypertrophy and Accelerates Cell Death. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2017). doi:10.1681/ASN.2016050550
87. Albrecht, S., Wang, S., Holz, A., Bergter, A. & Paululat, A. The ADAM metalloprotease Kuzbanian is crucial for proper heart formation in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Dev.*

(2006). doi:10.1016/j.mod.2006.03.005

88. Na, J. *et al.* A Drosophila Model of High Sugar Diet-Induced Cardiomyopathy. *PLoS Genet.* **9**, (2013).
89. Muqit, M. M. K. & Feany, M. B. Modelling neurodegenerative diseases in Drosophila: A fruitful approach? *Nat. Rev. Neurosci.* (2002). doi:10.1038/nrn751
90. Sadowski, C. E. *et al.* A Single-Gene Cause in 29.5% of Cases of Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2015). doi:10.1681/ASN.2014050489
91. Lovric, S., Ashraf, S., Tan, W. & Hildebrandt, F. Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: When and how? *Nephrology Dialysis Transplantation* (2016). doi:10.1093/ndt/gfv355
92. Trautmann, A. *et al.* Spectrum of steroid-resistant and congenital nephrotic syndrome in children: The podoNet registry cohort. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* (2015). doi:10.2215/CJN.06260614
93. Giglio, S. *et al.* Heterogeneous Genetic Alterations in Sporadic Nephrotic Syndrome Associate with Resistance to Immunosuppression. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2015). doi:10.1681/asn.2013111155
94. Gee, H. Y. *et al.* KANK deficiency leads to podocyte dysfunction and nephrotic syndrome. *J. Clin. Invest.* **125**, 2375–2384 (2015).
95. Gee, H. Y. *et al.* ARHGDI1 mutations cause nephrotic syndrome via defective RHO GTPase signaling. *J. Clin. Invest.* (2013). doi:10.1172/JCI69134
96. Ashraf, S. *et al.* ADCK4 mutations promote steroid-Resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption. *J. Clin. Invest.* (2013). doi:10.1172/JCI69000
97. Lovric, S. *et al.* Mutations in sphingosine-1-phosphate lyase cause nephrosis with ichthyosis and adrenal insufficiency. *J. Clin. Invest.* (2017). doi:10.1172/JCI89626
98. Diomedei-Camassei, F. *et al.* COQ2 Nephropathy: A Newly Described Inherited Mitochondriopathy with Primary Renal Involvement. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2007). doi:10.1681/asn.2006080833
99. McCarthy, H. J. *et al.* Simultaneous sequencing of 24 genes associated with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* (2013). doi:10.2215/CJN.07200712
100. Na, J., Sweetwyne, M. T., Park, A. S. D., Susztak, K. & Cagan, R. L. Diet-induced podocyte dysfunction in drosophila and mammals. *Cell Rep.* **12**, (2015).
101. Beckerman, P. *et al.* Transgenic expression of human APOL1 risk variants in podocytes induces kidney disease in mice. *Nat. Med.* (2017). doi:10.1038/nm.4287
102. Miller, J. *et al.* Drosophila melanogaster as an emerging translational model of human nephrolithiasis. *Journal of Urology* (2013). doi:10.1016/j.juro.2013.03.010
103. Knauf, F. & Preisig, P. A. Drosophila: A fruitful model for calcium oxalate nephrolithiasis. *Kidney International* (2011). doi:10.1038/ki.2011.166
104. Gamberi, C., Hipfner, D. R., Trudel, M. & Lubell, W. D. Bicaudal C mutation causes myc and TOR pathway up-regulation and polycystic kidney disease-like phenotypes in Drosophila. *PLoS Genet.* (2017). doi:10.1371/journal.pgen.1006694

105. Millet-Boureima, C., Porras Marroquin, J. & Gamberi, C. Modeling Renal Disease 'on the Fly'. *BioMed Research International* (2018). doi:10.1155/2018/5697436
106. Hildebrandt, F. Genetics of Kidney Diseases. *Seminars in Nephrology* **36**, 472–474 (2016).
107. Vivante, A. & Hildebrandt, F. Exploring the genetic basis of early-onset chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology* **12**, 133–146 (2016).
108. Vivante, A. & Hildebrandt, F. Exome Sequencing Frequently Reveals the Cause of Early-Onset Chronic Kidney Disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **12**, 133–146 (2016).
109. Marrachelli, V. G. *et al.* Genomic and metabolomic profile associated to microalbuminuria. *PLoS One* **9**, e98227 (2014).
110. Rastaldi, M. P. *et al.* Glomerular Podocytes Possess the Synaptic Vesicle Molecule Rab3A and Its Specific Effector Rabphilin-3a. *Am. J. Pathol.* **163**, 889–899 (2003).
111. Mizoguchi, A. *et al.* Localization of Rabphilin-3A on the Synaptic Vesicle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 1235–1243 (1994).
112. Fukuda, M., Kanno, E. & Yamamoto, A. Rabphilin and Noc2 Are Recruited to Dense-core Vesicles through Specific Interaction with Rab27A in PC12 Cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 13065–13075 (2004).
113. Burns, M. E., Sasaki, T., Takai, Y. & Augustine, G. J. Rabphilin-3A: A Multifunctional Regulator of Synaptic Vesicle Traffic. *J. Gen. Physiol.* **111**, 243–255 (1998).
114. Südhof, T. C. Function of Rab3 GDP-GTP exchange. *Neuron* (1997). doi:10.1016/S0896-6273(00)80292-5
115. Schwartz, S. L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A. & Wandinger-Ness, A. Rab GTPases at a glance. *J. Cell Sci.* (2008). doi:10.1242/jcs.03495
116. Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2009). doi:10.1038/nrm2728
117. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2001). doi:10.1038/35052055
118. Cormont, M. *et al.* CD2AP/CMS regulates endosome morphology and traffic to the degradative pathway through its interaction with Rab4 and c-Cbl. *Traffic* (2003). doi:10.1034/j.1600-0854.2003.40205.x
119. Babayeva, S. *et al.* Planar cell polarity pathway regulates nephrin endocytosis in developing podocytes. *J. Biol. Chem.* (2013). doi:10.1074/jbc.M113.452904
120. Kato, M. *et al.* Physical and Functional Interaction of Rabphilin-3A with α -Actinin. *J. Biol. Chem.* **271**, 31775–31778 (1996).
121. Giardino, L. *et al.* Podocyte Glutamatergic Signaling Contributes to the Function of the Glomerular Filtration Barrier. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2009). doi:10.1681/asn.2008121286
122. Hwang, S.-J., Yang, Q., Meigs, J. B., Pearce, E. N. & Fox, C. S. A genome-wide association for kidney function and endocrine-related traits in the NHLBI's Framingham Heart Study. *BMC Med Genet* (2007).
123. Simons, M., Reiser, J., Saffrich, R. & Mundel, P. Directed membrane transport is involved in process formation in cultured podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* (1999).

124. Satoh, D. *et al.* APKC λ maintains the integrity of the glomerular slit diaphragm through trafficking of nephrin to the cell surface. *J. Biochem.* (2014). doi:10.1093/jb/mvu022
125. Gámez-Valero, A., Lozano-Ramos, S. I., Bancu, I., Lauzurica-Valdemoros, R. & Borràs, F. E. Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases. *Frontiers in Immunology* (2015). doi:10.3389/fimmu.2015.00006
126. Ranghino, A., Dimuccio, V., Papadimitriou, E. & Bussolati, B. Extracellular vesicles in the urine: Markers and mediators of tissue damage and regeneration. *Clin. Kidney J.* (2015). doi:10.1093/ckj/sfu136
127. Rastaldi, M. P. *et al.* Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles. *FASEB J.* (2006). doi:10.1096/fj.05-4962fje
128. Fu, Y. *et al.* Comprehensive functional analysis of Rab GTPases in *Drosophila* nephrocytes. *Cell Tissue Res.* **368**, 615–627 (2017).
129. Bechtel, W. *et al.* Vps34 Deficiency Reveals the Importance of Endocytosis for Podocyte Homeostasis. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2013). doi:10.1681/ASN.2012070700
130. Bright, R. Cases and observations illustrative of renal disease accompanied with the secretion of albumin. *Guy's Hospital Reports* (1836). doi:10.1016/S0140-6736(13)60595-4
131. Gansevoort, R. T. *et al.* Chronic kidney disease and cardiovascular risk: Epidemiology, mechanisms, and prevention. *The Lancet* (2013). doi:10.1016/S0140-6736(13)60595-4
132. Tuegel, C. & Bansal, N. Heart failure in patients with kidney disease. *Heart* (2017). doi:10.1136/heartjnl-2016-310794
133. USRDS. 2015 USRDS Annual Data Report Volume 1: CKD in the United States. *United States Ren. Data Syst.* (2016). doi:10.1053/j.ajkd.2016.02.002
134. USRDS. 2015 USRDS Annual Data Report Volume 2: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *United States Ren. Data Syst.* (2016).
135. Shulman, N. B. *et al.* Prognostic value of serum creatinine and effect of treatment of hypertension on renal function: Results from the hypertension detection and follow-up program. *Hypertension* (1989).
136. Rahman, M. *et al.* Association between chronic kidney disease progression and cardiovascular disease: Results from the CRIC study. *Am. J. Nephrol.* (2014). doi:10.1159/000368915
137. McAlister, F. A., Ezekowitz, J., Tonelli, M. & Armstrong, P. W. Renal Insufficiency and Heart Failure: Prognostic and Therapeutic Implications from a Prospective Cohort Study. *Circulation* (2004). doi:10.1161/01.CIR.0000116764.53225.A9
138. Dubin, R. F. *et al.* Proteomic analysis of heart failure hospitalization among patients with chronic kidney disease: The heart and soul study. *PLoS One* (2018). doi:10.1371/journal.pone.0208042
139. Sarnak, M. J. *et al.* Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease. *Hypertension* (2003). doi:10.1161/01.hyp.0000102971.85504.7c
140. Wu, G. *et al.* Increased myocardial Rab GTPase expression: A consequence and cause of cardiomyopathy. *Circ. Res.* (2001). doi:10.1161/hh2401.100427

141. Zhang, Y. *et al.* Overexpression of microRNA-133b reduces myocardial injuries in children with viral myocarditis by targeting Rab27B gene. *Cell. Mol. Biol.* (2017). doi:10.14715/cmb/2017.63.10.13
142. United States Renal Data System. 2014 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2014.* (2012).
143. Reutens, A. T. Epidemiology of Diabetic Kidney Disease. *Medical Clinics of North America* (2013). doi:10.1016/j.mcna.2012.10.001
144. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 8th edn. *Brussels, Belgium Int. Diabetes Fed.* (2017). doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8.
145. Pálsson, R. & Patel, U. D. Cardiovascular complications of diabetic kidney disease. *Advances in Chronic Kidney Disease* (2014). doi:10.1053/j.ackd.2014.03.003
146. Taal, M. W. Risk Factors and Chronic Kidney Disease. in *Brenner and Rector's The Kidney* (2011). doi:10.1016/b978-1-4160-6193-9.10021-1
147. Lim, A. K. H. Diabetic nephropathy – Complications and treatment. *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.* (2014). doi:10.2147/IJNRD.S40172
148. Alicic, R. Z., Rooney, M. T. & Tuttle, K. R. Diabetic kidney disease: Challenges, progress, and possibilities. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* (2017). doi:10.2215/CJN.11491116
149. Mauer, S. M. Structural-functional correlations of diabetic nephropathy. in *Kidney International* (1994). doi:10.1038/ki.1994.80
150. Fioretto, P., Caramori, M. L. & Mauer, M. The kidney in diabetes: Dynamic pathways of injury and repair. The Camillo Golgi Lecture 2007. *Diabetologia* (2008). doi:10.1007/s00125-008-1051-7
151. Breyer, M. D. *et al.* Mouse models of diabetic nephropathy. [Review] [245 refs]. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2005).
152. Alpers, C. E. & Hudkins, K. L. Mouse models of diabetic nephropathy. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* (2011). doi:10.1097/MNH.0b013e3283451901
153. Kitada, M., Ogura, Y. & Koya, D. Rodent models of diabetic nephropathy: Their utility and limitations. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease* (2016). doi:10.2147/IJNRD.S103784
154. Betz, B. & Conway, B. R. An Update on the Use of Animal Models in Diabetic Nephropathy Research. *Current Diabetes Reports* (2016). doi:10.1007/s11892-015-0706-2
155. Zhao, H. J. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase deficiency produces accelerated nephropathy in diabetic mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2006). doi:10.1681/ASN.2006070798
156. Nakagawa, T. *et al.* Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2007). doi:10.1681/ASN.2006050459
157. Nakagawa, T. *et al.* Endothelial dysfunction as a potential contributor in diabetic nephropathy. *Nature Reviews Nephrology* (2011). doi:10.1038/nrneph.2010.152
158. Deji, N. *et al.* Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* (2009). doi:10.1152/ajprenal.00110.2008

159. Kern, T. S. & Engerman, R. L. Kidney morphology in experimental hyperglycemia. *Diabetes* (1987).
160. Maile, L. A. *et al.* Blocking ligand occupancy of the $\alpha V\beta 3$ integrin inhibits the development of nephropathy in diabetic pigs. *Endocrinology* (2014). doi:10.1210/en.2014-1318
161. Heckler, K. & Kroll, J. Zebrafish as a model for the study of microvascular complications of diabetes and their mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* (2017). doi:10.3390/ijms18092002
162. Intine, R. V., Olsen, A. S. & Sarra, M. P. A zebrafish model of diabetes mellitus and metabolic memory. *J. Vis. Exp.* (2013).
163. Graham, P. & Pick, L. Drosophila as a Model for Diabetes and Diseases of Insulin Resistance. in *Current Topics in Developmental Biology* (2017). doi:10.1016/bs.ctdb.2016.07.011
164. Rulifson, E. J., Kim, S. K. & Nusse, R. Ablation of insulin-producing neurons in flies: Growth and diabetic phenotypes. *Science* (80-.). (2002). doi:10.1126/science.1070058
165. Haselton, A. *et al.* Partial ablation of adult drosophila insulin-producing neurons modulates glucose homeostasis and extends life span without insulin resistance. *Cell Cycle* (2010). doi:10.4161/cc.9.15.12458
166. Teumer, A. *et al.* Genome-wide association studies identify genetic loci associated with Albuminuria in diabetes. *Diabetes* (2016). doi:10.2337/db15-1313
167. Gonzalez Jr, L. & Scheller, R. H. Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex. *Cell* **96**, 755 (1999).
168. Helmstädter, M., Huber, T. B. & Hermle, T. Using the Drosophila Nephrocyte to Model Podocyte Function and Disease. *Front. Pediatr.* **5**, 262 (2017).
169. Na, J. & Cagan, R. The Drosophila Nephrocyte: Back on Stage. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 161–163 (2013).
170. Selma-Soriano Estela, Chakraborty Mouli, L. B. & A. R. Ex-vivo characterization of Drosophila heart functional parameters. *Nat. Protoc. Exch.* (2018). doi:10.1038/protex.2018.034
171. Selma-Soriano, E., Artero, R. & Llamusi, B. Optical Cross-Sectional Muscle Area Determination of Drosophila Melanogaster Adult Indirect Flight Muscles. *J. Vis. Exp.* 1–6 (2018). doi:10.3791/56179
172. Raiborg, C., Grønvold Bache, K., Mehlum, A., Stang, E. & Stenmark, H. Hrs recruits clathrin to early endosomes. *EMBO J.* (2001). doi:10.1093/emboj/20.17.5008
173. Raiborg, C. & Stenmark, H. Hrs and endocytic sorting of ubiquitinated membrane proteins. *Cell Struct. Funct.* (2002). doi:10.1247/csf.27.403
174. Niederreither, K. & Dollé, P. Retinoic acid in development: Towards an integrated view. *Nature Reviews Genetics* (2008). doi:10.1038/nrg2340
175. Sharma, S., Mallipattu, S. K., Zhong, Y. & He, J. C. Retinoic acid: A potential pharmacologic approach in the treatment of podocytopathy. in *Podocytopathy* (2014). doi:10.1159/000360114
176. Mallipattu, S. K. & He, J. C. The Beneficial Role of Retinoids in Glomerular Disease. *Front. Med.* (2015). doi:10.3389/fmed.2015.00016

177. Mallipattu, S. K. *et al.* Kruppel-Like Factor 15 Mediates Glucocorticoid-Induced Restoration of Podocyte Differentiation Markers. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2016). doi:10.1681/ASN.2015060672
178. Chen, J., Chen, M. X., Fogo, A. B., Harris, R. C. & Chen, J.-K. mVps34 deletion in podocytes causes glomerulosclerosis by disrupting intracellular vesicle trafficking. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2013). doi:10.1681/ASN.2012010101
179. Muraleedharan, S., Skaer, H. & Inamdar, M. S. Networks that link cytoskeletal regulators and diaphragm proteins underpin filtration function in *Drosophila* nephrocytes. *Exp. Cell Res.* 0–1 (2016). doi:10.1016/j.yexcr.2018.02.015
180. U., Q. *et al.* Arterial tissue transcriptional profiles associate with tissue remodeling and cardiovascular phenotype in children with end-stage kidney disease. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* (2018). doi:10.5414/NHX01932
181. Bier, E. & Bodmer, R. *Drosophila*, an emerging model for cardiac disease. *Gene* **342**, 1–11 (2004).
182. Piazza, N. & Wessells, R. J. *Drosophila* models of cardiac disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* (2011). doi:10.1016/B978-0-12-384878-9.00005-4
183. Nishimura, M., Ocorr, K., Bodmer, R. & Cartry, J. *Drosophila* as a model to study cardiac aging. *Exp. Gerontol.* (2011). doi:10.1016/j.exger.2010.11.035
184. Lim, H. Y., Wang, W., Chen, J., Ocorr, K. & Bodmer, R. ROS regulate cardiac function via a distinct paracrine mechanism. *Cell Rep.* **7**, 35–44 (2014).
185. Wolf, M. J. SPARCling Study of a *Drosophila* Cardiomyopathy. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **9**, 104–106 (2016).
186. Chakraborty, M., Llamusi, B. & Artero, R. Modeling of myotonic dystrophy cardiac phenotypes in *Drosophila*. *Frontiers in Neurology* (2018). doi:10.3389/fneur.2018.00473
187. Ocorr, K., Fink, M., Cammarato, A., Bernstein, S. & Bodmer, R. Semi-automated Optical Heartbeat Analysis of small hearts. *J. Vis. Exp.* 3–6 (2009). doi:10.3791/1435
188. Kocherlakota, K. S., Wu, J. M., McDermott, J. & Abmayr, S. M. Analysis of the cell adhesion molecule sticks-and-stones reveals multiple redundant functional domains, protein-interaction motifs and phosphorylated tyrosines that direct myoblast fusion in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* (2008). doi:10.1534/genetics.107.083808
189. Alvarez, A. D. pannier and pointedP2 act sequentially to regulate *Drosophila* heart development. *Development* (2003). doi:10.1242/dev.00488
190. Chartier, A., Zaffran, S., Astier, M., Sémériva, M. & Gratecos, D. Pericardin, a *Drosophila* type IV collagen-like protein is involved in the morphogenesis and maintenance of the heart epithelium during dorsal ectoderm closure. *Development* (2002).
191. Yi, P., Han, Z., Li, X. & Olson, E. H. The mevalonate pathway controls heart formation in *Drosophila* by isoprenylation of Gy1. *Science* (80-.). (2006). doi:10.1126/science.1127704
192. Miller, A. Chapter 6: The Internal Anatomy and Histology of the Imago of *Drosophila melanogaster*. in *Biology of Drosophila* (1950).
193. Matyushenko, A. M. *et al.* The effects of cardiomyopathy-associated mutations in the head-to-tail overlap junction of α -tropomyosin on its properties and interaction with actin. *Int. J.*

Biol. Macromol. (2019). doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.105

194. Vang, S. *et al.* Actin mutations in hypertrophic and dilated cardiomyopathy cause inefficient protein folding and perturbed filament formation. *FEBS J.* (2005). doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04630.x
195. Diguët, N. *et al.* Muscle creatine kinase deficiency triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced glycation end products in dilated cardiomyopathy. *J. Biol. Chem.* (2011). doi:10.1074/jbc.M111.252395
196. Liu, G. *et al.* Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J. Clin. Invest.* (2003). doi:10.1172/JCI200318242
197. Barletta, G. M., Kovari, I. A., Verma, R. K., Kerjaschki, D. & Holzman, L. B. Nephrin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. *J. Biol. Chem.* (2003). doi:10.1074/jbc.M301279200
198. Carson, J. M. *et al.* Podocytes degrade endocytosed albumin primarily in lysosomes. *PLoS One* (2014). doi:10.1371/journal.pone.0099771
199. Swiatecka-Urban, A. Membrane trafficking in podocyte health and disease. *Pediatric Nephrology* (2013). doi:10.1007/s00467-012-2281-y
200. Rani, L. & Gautam, N. K. Drosophila Renal Organ as a Model for Identification of Targets and Screening of Potential Therapeutic Agents for Diabetic Nephropathy. *Curr. Drug Targets* (2018). doi:10.2174/1389450119666180808114533
201. Parr, S. K. *et al.* Acute kidney injury is a risk factor for subsequent proteinuria. *Kidney Int.* (2018). doi:10.1016/j.kint.2017.07.007
202. Susztak, K. & Böttinger, E. P. Diabetic nephropathy: A frontier for personalized medicine. *Journal of the American Society of Nephrology* (2006). doi:10.1681/ASN.2005101109
203. Goldenberg, N. M. & Silverman, M. Rab34 and its effector munc13-2 constitute a new pathway modulating protein secretion in the cellular response to hyperglycemia. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* (2009). doi:10.1152/ajpcell.00286.2009
204. Hu, C. *et al.* Insights into the Mechanisms Involved in the Expression and Regulation of Extracellular Matrix Proteins in Diabetic Nephropathy. *Curr. Med. Chem.* (2015). doi:10.2174/0929867322666150625095407
205. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107–117 (2001).
206. Helmstädter, M. *et al.* Functional study of mammalian Neph proteins in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* **7**, (2012).
207. García-López, A., Llamusi, B., Orzáez, M., Pérez-Payá, E. & Artero, R. D. In vivo discovery of a peptide that prevents CUG-RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 11866–11871 (2011).
208. Perkovic, V. *et al.* Canagliflozin and renal outcomes in type 2 diabetes and nephropathy. *N. Engl. J. Med.* (2019). doi:10.1056/NEJMoa1811744
209. Yale, J. F. Oral antihyperglycemic agents and renal disease: New agents, new concepts. in *Journal of the American Society of Nephrology* (2005). doi:10.1681/ASN.2004110974

210. Friedman, A. L. & Chesney, R. W. Glucocorticoids in renal disease. Theoretical basis, consequences and efficiency of use in the pediatric patient. *Am. J. Nephrol.* (1982). doi:10.1159/000166673
211. Ponticelli, C. & Locatelli, F. Glucocorticoids in the treatment of glomerular diseases: Pitfalls and pearls. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* (2018). doi:10.2215/CJN.12991117
212. Hunter, R. W., Ivy, J. R. & Bailey, M. A. Glucocorticoids and renal Na⁺ transport: Implications for hypertension and salt sensitivity. *J. Physiol.* (2014). doi:10.1113/jphysiol.2013.267609
213. Rhen, T. & Cidlowski, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids - New mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine* (2005). doi:10.1056/NEJMr050541
214. Plantinga, L. *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drug use among persons with chronic kidney disease in the United States. *Ann. Fam. Med.* (2011). doi:10.1370/afm.1302
215. Schäcke, H., Döcke, W. D. & Asadullah, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology and Therapeutics* (2002). doi:10.1016/S0163-7258(02)00297-8
216. Weide, T. & Huber, T. B. Signaling at the slit: Podocytes chat by synaptic transmission. *Journal of the American Society of Nephrology* (2009). doi:10.1681/ASN.2009070691
217. Kobayashi, N. Mechanism of the process formation; podocytes vs. neurons. *Microsc. Res. Tech.* (2002). doi:10.1002/jemt.10077
218. Lee, C. Y., Chen, C. C. & Liou, H. H. Levetiracetam inhibits glutamate transmission through presynaptic P/Q-type calcium channels on the granule cells of the dentate gyrus. *Br. J. Pharmacol.* (2009). doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00463.x
219. Sanz-Blasco, S., Piña-Crespo, J. C., Zhang, X., McKercher, S. R. & Lipton, S. A. Levetiracetam inhibits oligomeric A β -induced glutamate release from human astrocytes. *Neuroreport* (2016). doi:10.1097/WNR.0000000000000601
220. Guo, Y. *et al.* Podocyte-Specific Induction of Krüppel-Like Factor 15 Restores Differentiation Markers and Attenuates Kidney Injury in Proteinuric Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2018). doi:10.1681/ASN.2018030324
221. Zhang, J., Zhong, H.-B., Lin, Y., Yao, W. & Huang, J.-Y. KLF15 suppresses cell proliferation and extracellular matrix expression in mesangial cells under high glucose. *Int. J. Clin. Exp. Med.* (2015).

ANEXO

ANEXO

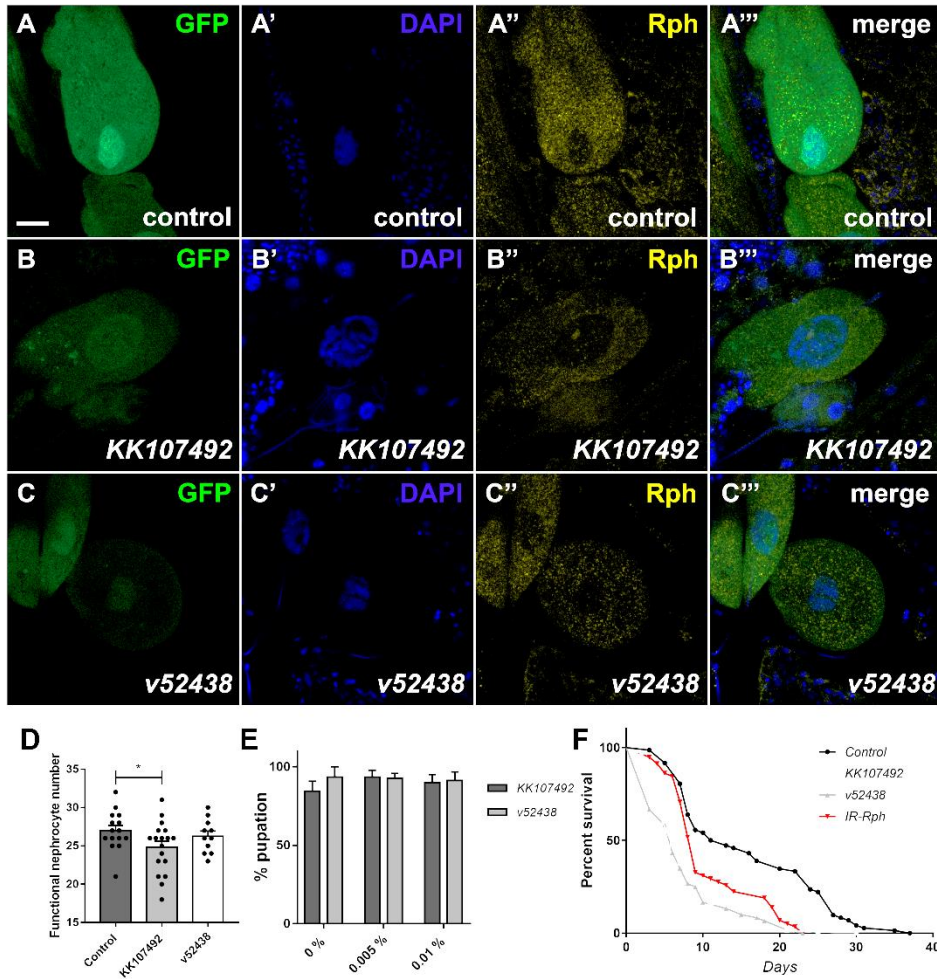


Figura Anexo 1.1. Otras líneas de *Drosophila* con expresión de interferencia de *Rph* en nefrocitos tuvieron una reducción en el número de nefrocitos funcionales y en la supervivencia. Imágenes confocales de nefrocitos de moscas adultas que expresan el reportero GFP (verde en A, B y C) bajo el control de *Hand-Gal4*. La inmunotinción con anticuerpo *anti-Rph* (A'', A''', B'', B''', C'' y C''') reveló la presencia de *Rph* en nefrocitos pericárdicos de moscas de control (A-A'''), pero esta señal se redujo en las moscas que expresaban la construcción RNAi de *Rph* (B-B''' y C-C'''). Los núcleos se contrastaron con DAPI (azul). Barra de escala = 10 μ m. Cuantificación del número medio de nefrocitos pericárdicos funcionales (D). El porcentaje de pupación de moscas *IR-Rph* fue el mismo en larvas alimentadas con concentraciones de 0.005% y 0.01% de AgNO_3 (E). Prueba estadística *t de Student* de dos colas ($\alpha = 0.05$). * $p < 0.05$. Las curvas de supervivencia de moscas *IR-Rph* (*Hand-Gal4* > *UAS-IR-Rph*) alimentadas con alimento estándar, mostraron que la supervivencia de las moscas adultas *IR-Rph* se vio afectada en comparación con los controles (*log-rank* (Mantel-Cox)) (F).

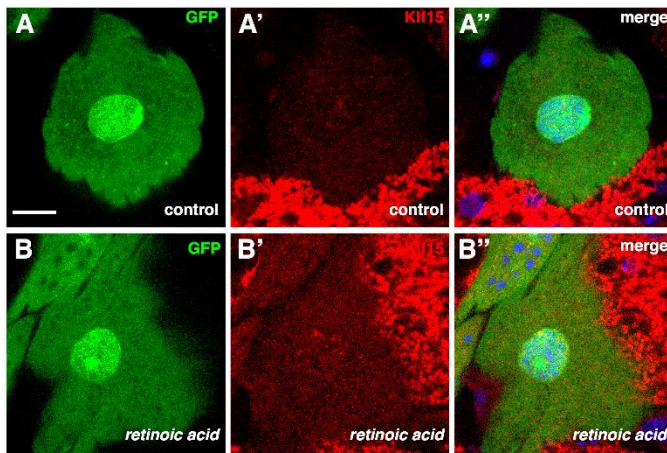


Figura Anexo 1.2. El ácido retinoico aumenta la expresión de *Klf15* en los nefrocitos pericárdicos. Imágenes de microscopía de fluorescencia de nefrocitos pericárdicos controles (*Hand-Gal4*> *UAS-GFP*; A) y nefrocitos pericárdicos suplementados con ácido retinoico (B) marcado con GFP (verde) e inmunoteñidos con un anticuerpo *anti-Klf15* (rojo). Esto muestra la especificidad del anticuerpo.

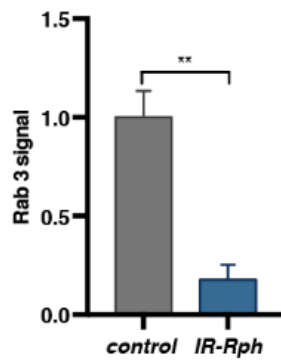


Figura Anexo 1.3. La interferencia de la expresión de *Rph* disminuye el número de vesículas Rab 3 positivas. Cuantificación de la señal de Rab 3 a partir de imágenes del inmunoensayo de nefrocitos control (*Hand-Gal4*> *UAS-GFP* *yw*) y nefrocitos con la expresión de *Rph* interferida (*HandGal4*> *UAS-GFP* *UAS-IR-Rph*). Prueba estadística *t de Student* de dos colas ($\alpha = 0.05$). ** $p < 0.001$.

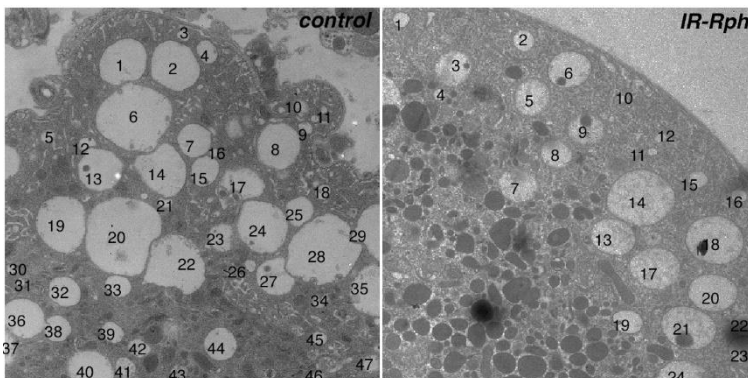


Figura Anexo 1.4. La interferencia de la expresión de *Rph* reduce el número de endosomas en nefrocitos pericárdicos. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de nefrocitos pericárdicos control (*Hand-Gal4>UAS-GFP*) y con interferencia en la expresión de *Rph* (*Hand-Gal4> UAS-GFP UAS-IR-Rph*). Los números indican la cantidad de endosomas.

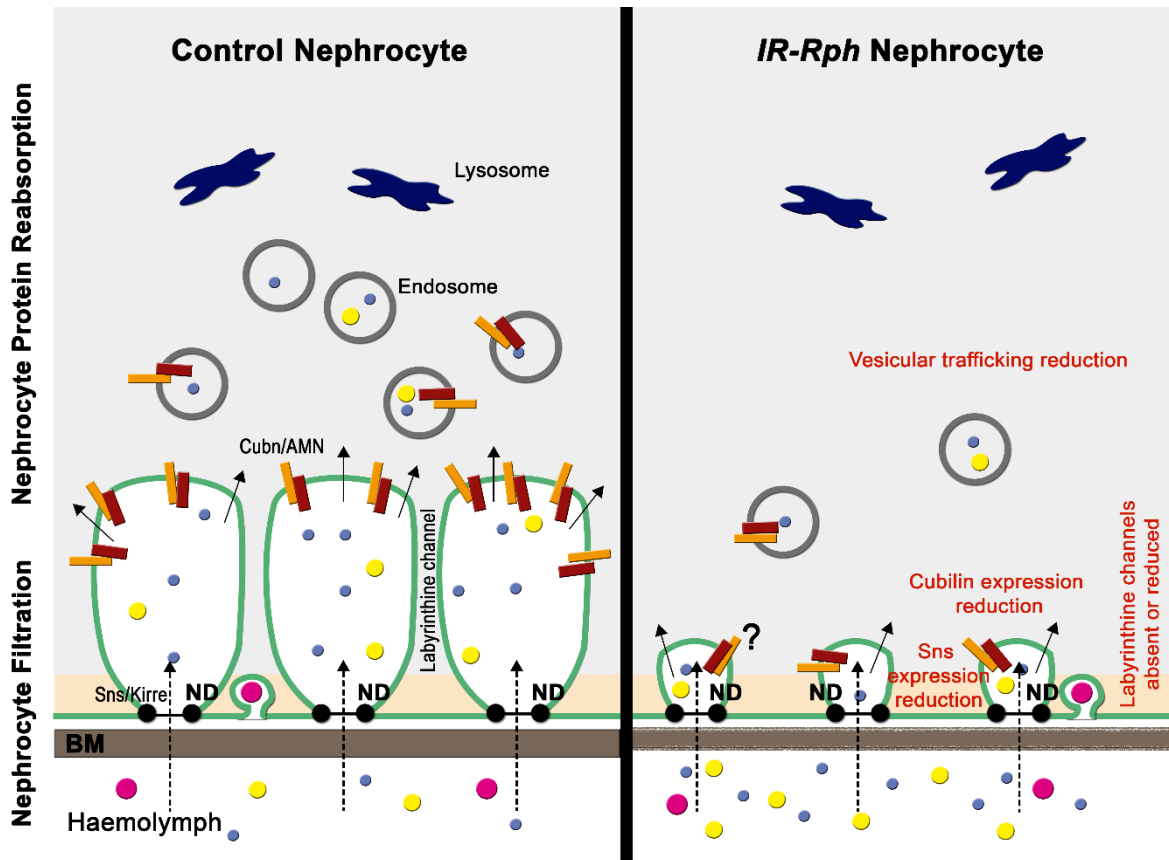


Figura Anexo 1.5. Modelo esquemático de las alteraciones causadas por la interferencia de la expresión de *Rph* en los nefrocitos de *Drosophila*. La interferencia de la expresión de *Rph* afecta a la filtración de nefrocitos mediante la reducción de la expresión de *Sns* y a la reabsorción de proteínas de nefrocitos mediante la reducción del tráfico vesicular y la expresión de *Cubilin*; también afecta a la estructura de los canales laberínticos. La filtración de nefrocitos se indica mediante flechas discontinuas y la reabsorción de proteínas se indica mediante flechas cortas. La diversidad de moléculas presentes en la hemolinfa está representada por círculos de colores de diferentes tamaños. BM, membrana basal; ND, diafragma de nefrocitos.

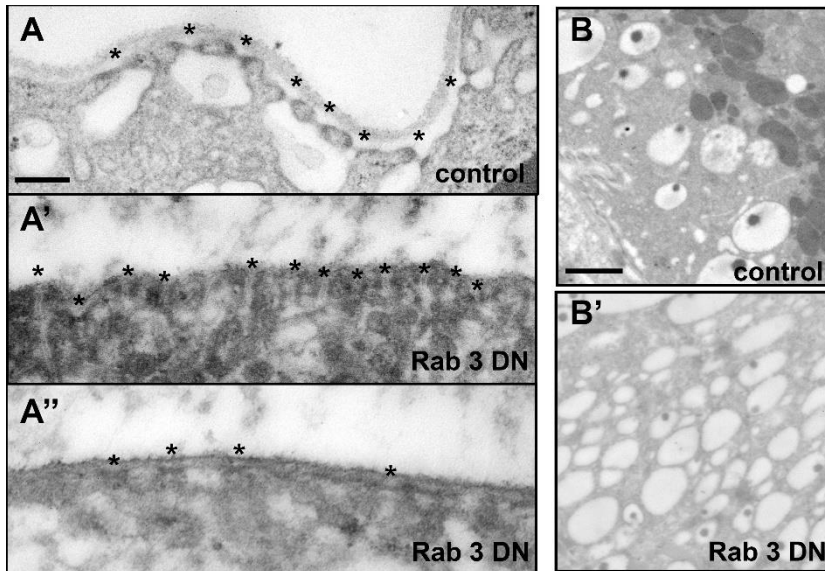


Figura Anexo 3.1. La expresión de la versión DN de Rab 3 promueve la desorganización de los NDs y la falta de membrana basal de los nefrocitos. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la membrana (A-A'') y de los endosomas (B y B') de los nefrocitos pericárdicos control (A y B) y con expresión de Rab 3 DN (A', A'' y B'). El (*) marca los NDs. Barra de escala en A-A''= 200 nm, barra de escala en B y B'= 1 μ m.